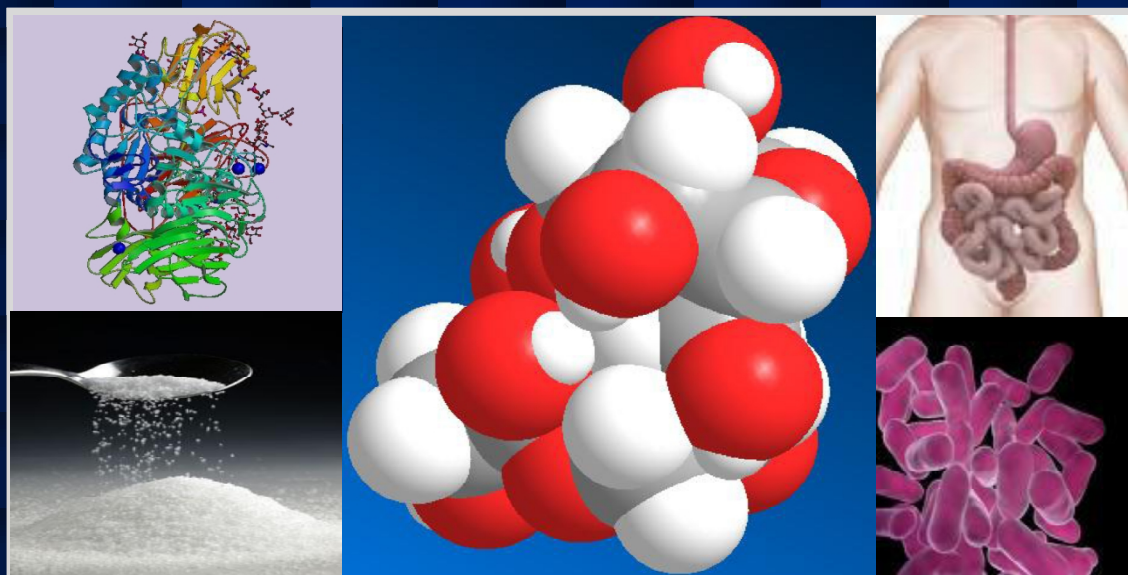


**SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y ESTUDIO DEL
CARÁCTER PREBIÓTICO DE OLIGOSACÁRIDOS
DERIVADOS DE LA LACTULOSA**



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID
INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES
ALEJANDRA CARDELLE COBAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Química Física Aplicada

**SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y ESTUDIO DEL
CARÁCTER PREBIÓTICO DE OLIGOSACÁRIDOS
DERIVADOS DE LA LACTULOSA**

Memoria presentada por

ALEJANDRA CARDELLE COBAS

Para optar al grado de

Doctor en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Directores:

Dras. Nieves Corzo Sánchez y Mar Villamiel Guerra

Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC)

ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	V
ABREVIATURAS.....	XV

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1.-INTRODUCCIÓN.....	3
1.1.-Microbiota intestinal.....	4
1.1.1.-Composición	5
1.1.2.-Actividad	8
1.1.2.1.-Ácidos grasos de cadena corta (SCFAs).....	9
1.2.-Prebióticos.....	14
1.2.1.-Oligosacáridos como prebióticos	16
1.2.1.1.-Propiedades físicoquímicas	19
1.2.1.2.-Propiedades fisiológicas.....	20
1.2.1.3.-Lactulosa.....	23
1.2.1.4.-Fructooligosacáridos (FOS).....	26
1.2.1.5.-Galactooligosacáridos (GOS)	28
1.2.1.5.1.- Transgalactosilación	29
1.2.1.5.2.- Cinética de las reacciones de hidrólisis y transgalactosilación.....	30
1.2.1.5.3.- Preparados enzimáticos comerciales	33
1.2.1.5.4.- Galactooligosacáridos comerciales	34
1.3.-Métodos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> para la determinación del carácter prebiótico	36
1.4.-Técnicas de Biología Molecular para la determinación de poblaciones bacterianas.....	40
1.4.1.- Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)	41
1.4.2.- Fluorescencia con Hibridación <i>In Situ</i> (FISH)	42
2.- OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	47
2.1.- Objetivos	47
2.2.- Plan de trabajo	48
3.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
3.1.- Reactivos	51
3.2.- Caracterización enzimática.....	51
3.3.- Obtención de oligosacáridos derivados de la lactulosa	53
3.3.1.- Hidrólisis y transgalactosilación	53

3.3.1.1.- Utilización de la β -galactosidasa de <i>Kluyveromyces lactis</i>	53
3.3.1.2.- Utilización de la β -galactosidasa de <i>Aspergillus aculeatus</i> ...	54
3.3.1.3.- Utilización de la β -galactosidasa de <i>Aspergillus oryzae</i>	55
3.3.1.3.1.- Síntesis con la enzima soluble	55
3.3.1.3.2.- Síntesis con la enzima inmovilizada.....	55
3.3.2.- Obtención mediante isomerización de galactooligosacáridos (GOS) sintetizados.....	56
3.3.2.1.- Hidrólisis y transgalactosilación de la lactosa	56
3.3.2.2.- Isomerización de los galactooligosacáridos sintetizados ...	56
3.3.3.- Isomerización de la mezcla comercial de galactooligosacáridos VivinalGOS.....	57
3.4.-Estudios de fermentación <i>in vitro</i> de los oligosacáridos sintetizados	57
3.4.1.- Crecimiento en cultivos de microorganismos puros	57
3.4.1.1.- Ensayos de fermentación y evaluación del crecimiento bacteriano.....	58
3.4.2.- Crecimiento de bacterias en cultivos mixtos de muestras fecales humanas.....	58
3.4.2.1.- Determinación del carácter bifidogénico.....	58
3.4.2.1.1- Ensayos de fermentación.....	59
3.4.2.1.2.- Cuantificación de la población de bifidobacterias por PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).....	59
3.4.2.2.- Determinación <i>in vitro</i> del carácter prebiótico	60
3.4.2.2.1- Ensayos de fermentación.....	60
3.4.2.2.2- Cuantificación de las poblaciones bacterianas mediante Fluorescencia con Hibridación <i>In Situ</i> (FISH).....	61
3.5.- Técnicas analíticas	63
3.5.1-Fraccionamiento de oligosacáridos	63
3.5.1.1- Tratamiento con carbón activo	63
3.5.1.2- Cromatografía de exclusión molecular (SEC).....	64
3.5.1.3- Cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de índice de refracción (HPLC-RI)	64
3.5.2.- Determinación de carbohidratos.....	65
3.5.2.1- Cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detección amperométrica de pulsos (HPAEC-PAD).....	65

[illegible]

4.1.2.2.1.- Optimización de la reacción de isomerización	127
4.1.3.- Isomerización de la mezcla comercial de galactooligosacáridos VivinalGOS.....	132
4.1.3.1.- Estudio de la composición en oligosacáridos	132
4.1.3.2.- Isomerización de la mezcla de GOS	134
4.2.- Modelización de la formación de oligosacáridos a partir de lactulosa por transgalactosilación	138
4.2.1.- Modelo a temperatura constante	139
4.2.2.- Modelo dependiente de la temperatura	147
4.3.- Estudios de fermentación <i>in vitro</i> de los oligosacáridos sintetizados ...	153
4.3.1.- Fraccionamiento de los oligosacáridos sintetizados y comerciales (VivinalGOS) para llevar a cabo los ensayos de fermentación	153
4.3.2.- Determinación del crecimiento de microorganismos puros en los oligosacáridos sintetizados	155
4.3.3.- Determinación del carácter bifidogénico	161
4.3.4.- Determinación del carácter prebiótico	165
5.-CONCLUSIONES.....	175
6.-BIBLIOGRAFÍA	179

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura I1. - Distribución y composición de las diferentes especies bacterianas en el tracto gastrointestinal.

Figura I2.-Clasificación de la flora bacteriana en función de sus efectos beneficiosos y perjudiciales sobre la salud.

Figura I3.-Principales vías de producción de los SCFAs y otros metabolitos por fermentación bacteriana en el lumen del colon.

Figura I4.-Esquema simplificado de las principales diferencias entre probióticos y prebióticos.

Figura I5.-Condiciones que han de cumplir los ingredientes en el tracto gastrointestinal para ser considerados como prebióticos.

Figura I6.-Principales diferencias en las vías metabólicas de los carbohidratos digeribles y los no digeribles.

Figura I7.-Representación esquemática de los procesos de producción de los oligosacáridos no digeribles (Sako y col., 1999).

Figura I8.-Estructura química de la lactulosa y sus posibles formas anoméricas.

Figura I9.-Estructuras químicas de la sacarosa (GF) y fructooligosacáridos (GF_n y FF_n).

Figura I10.-Estructura química de los galactooligosacáridos.

Figura I11.- Mecanismo de acción de la enzima β -galactosidasa en la obtención de GOS a partir de lactosa.

Figura I12.-Producción industrial de GOS.

Figura I13.- Modelos cinéticos propuestos por Boon y col. (1999) para describir la síntesis de oligosacáridos y la hidrólisis de la lactosa utilizando una β -galactosidasa de *Bacillus circulans*.

Figura I14.- Esquema del sistema de cultivo en tres etapas utilizado para simular las condiciones del colon humano.

Figura M1.-Sistema de fermentación *in vitro* de los oligosacáridos con las bacterias procedentes de muestras fecales.

Figura R1.-Perfil cromatográfico obtenido mediante HPAEC-PAD (método B) de la mezcla de síntesis obtenida tras la hidrólisis enzimática de lactulosa con la β -galactosidasa de *K. lactis*: 3 U/mL, 250 g/L de lactulosa, pH 7,5, 40°C y 2 h de reacción.

Figura R2.-Perfil cromatográfico obtenido del análisis por HPLC-RI de la mezcla de síntesis obtenida de la hidrólisis enzimática de la lactulosa con la β -galactosidasa de *K. lactis*: 3 U/mL de enzima, 250 g/L de lactulosa tras 6 h a pH 6,5 y 50°C.

Figura R3.-Estructuras de los isómeros del trisacárido 1.

Figura R4.-Espectro 1D-TOCSY del trisacárido 1 en D₂O (A) Excitación selectiva del protón anomérico a 4.43 ppm y (B) a 4.35 ppm.

Figura R5.-Espectro parcial de gHMBC para el trisacárido 1 con las correlaciones para los carbonos anoméricos (C2).

Figura R6.-Correlaciones ROESY intra-residuales (flechas continuas) e inter-residuales (flechas discontinuas) para los principales isómeros del trisacárido 1 en D₂O.

Figura R7.-Estructuras para los principales isómeros del trisacárido 2.

Figura R8.-Espectro parcial de gHMBC para el trisacárido 2 con las correlaciones para los carbonos anoméricos.

Figura R9.- Correlaciones ROESY intra-residuales (flechas continuas) e inter-residuales (flechas discontinuas) para los principales isómeros del trisacárido 2 en D₂O.

Figura R10.- Efecto de la temperatura en la producción de OS durante la hidrólisis enzimática de la lactulosa (250 g/L) con la β -galactosidasa de *K. lactis* (3 U/mL) a pH 6,5.

Figura R11.- Efecto de la concentración de sustrato en la producción de OS durante la hidrólisis enzimática de la lactulosa con la β -galactosidasa de *K. lactis* (3 U/mL) a pH 6,5 y 50°C.

Figura R12.- Efecto del pH en la producción de OS durante la hidrólisis enzimática de la lactulosa (250 g/ L) con la β -galactosidasa de *K. lactis* (3 U/mL) a 50°C.

Figura R13.- Efecto de la concentración de enzima en la producción de OS durante la hidrólisis enzimática de la lactulosa con la β -galactosidasa de *K. lactis*, 250 g/L de lactulosa, a pH 6,5 y 50°C.

Figura R14.- Efecto de la adición de galactosa y fructosa en la producción de 6'-galactosil-lactulosa (b y e) y 1-galactosil-lactulosa (c y f) y en la hidrólisis de lactulosa (a y d), durante la reacción de transgalactosilación, utilizando 250 g/L de lactulosa a 40°C en tampón fosfato 0,05 M pH 7,5 y 1 mM de MgCl_2 , 3 U/mL de β -galactosidasa y 6 horas.

Figura R15.- Perfil cromatográfico obtenido mediante el análisis por HPAEC-PAD de la mezcla de síntesis resultante de la hidrólisis enzimática de lactulosa con la β -galactosidasa de *A. aculeatus*: 16 U/mL de enzima, 650 g/L de lactulosa en tampón fosfato 0,1 M pH 6,5, 60°C y 7 h de reacción.

Figura R16.- Perfil cromatográfico de la mezcla de carbohidratos obtenidos mediante el análisis por HPLC-RI de las mezclas de síntesis obtenidas de la hidrólisis enzimática de lactulosa con la β -galactosidasa de *A. aculeatus*: 16 U/mL de enzima, 450 g/L de lactulosa tras 7 horas a 60°C y pH 6,5.

Figura R17.- Efecto de la temperatura en la producción de oligosacáridos durante la hidrólisis enzimática de lactulosa (650 g/L) con la β -galactosidasa de *A. aculeatus* (16 U/mL) a pH 6,5. OOS: otros oligosacáridos presentes en la mezcla de reacción.

Figura R18.- Efecto del pH en la producción de oligosacáridos durante la hidrólisis enzimática de lactulosa (650 g/L) con la β -galactosidasa de *A. aculeatus* (16 U/mL) 60°C. OOS: otros oligosacáridos presentes en la mezcla de reacción

Figura R19.- Efecto de la concentración de sustrato en la producción de oligosacáridos durante la hidrólisis enzimática de la lactulosa con la β -galactosidasa de *A. aculeatus* (16 U/mL) a pH 6,5 y 60°C. OOS: otros oligosacáridos.

Figura R20.- Efecto de la concentración de enzima en la producción de oligosacáridos la hidrólisis enzimática de lactulosa (450 g/L) con la β -galactosidasa de *A. aculeatus* a pH 6,5 y 60°C.

Figura R21.- Perfil cromatográfico obtenido mediante el análisis por HPAEC-PAD de la mezcla resultante de la hidrólisis enzimática de la lactulosa con la β -galactosidasa de *A. oryzae*: 16 U/mL de enzima, 450 g/L de lactulosa en tampón fosfato 0,1 M, pH 6,5, 50°C y 1 h de reacción.

Figura R22.- Perfiles cromatográficos de los productos resultantes de la hidrólisis de lactulosa con las β -galactosidasas de *K. lactis*, *A. aculeatus* y *A. oryzae*.

Figura R23.- Efecto de la temperatura en la producción de oligosacáridos durante la hidrólisis enzimática de lactulosa (450 g/L) con la β -galactosidasa de *A. oryzae* (8 U/mL) a pH 6,5.

Figura R24.- Efecto del pH en la producción de oligosacáridos durante la hidrólisis enzimática de la lactulosa (450 g/L) con la β -galactosidasa de *A. oryzae* (8 U/mL) a 50°C.

Figura R25.- Efecto de la temperatura en la producción de oligosacáridos durante la hidrólisis enzimática de lactulosa (450 g/L) con la β -galactosidasa de *A. oryzae* (8 U/mL) a pH 6,5.

Figura R26.- Efecto del pH en la producción de oligosacáridos durante la hidrólisis enzimática de lactulosa (450 g/L) con la β -galactosidasa de *A. oryzae* (8 U/mL) a 50°C.

Figura R27.- Perfiles cromatográficos obtenidos mediante HPAEC-PAD de las mezclas de reacción obtenidas por hidrólisis enzimática de la lactosa con la β -galactosidasa de *A. aculeatus* (a y c) 16 U/mL de enzima, 285 g/L de lactosa, 7 horas a 60°C y pH 6,5 y la β -galactosidasa de *K. lactis* (b y d): 3 U/mL de enzima, 250 g/L de lactosa, 2 h a pH 6,5 y 40°C. a y b: Método A. b y c: Método B (Ver Materiales y Métodos Apartado. 3.5.2.1).

Figura R28.- Estructura del trisacárido 6'-galactosil-lactosa.

Figura R29.- Perfil obtenido por HPAEC-PAD de la mezcla de carbohidratos resultante de la hidrólisis enzimática de la lactosa con la β -galactosidasa de *K. lactis* antes (A) y tras 9 h de isomerización a 40°C utilizando una relación molar aluminato/lactosa 3:1 (B).

Figura R30.- Estructuras químicas para la alolactosa (O- β -D-galactopiranosil (1 \rightarrow 6)-glucopiranosil) y la alolactulosa (O- β -D-galactopiranosil (1 \rightarrow 6)-fructofuranosil).

Figura R31.- Efecto de la concentración de aluminato en la isomerización de los GOS obtenidos mediante transgalactosilación de la lactosa con la β -galactosidasa de *K. lactis*.

Figura R32.- Efecto de la temperatura en la isomerización de los GOS obtenidos por transgalactosilación a partir de lactosa utilizando una relación aluminato/lactosa de 3/1.

Figura R33.- Cromatograma obtenido por HPAEC-PAD de la mezcla comercial de oligosacáridos prebióticos VivinalGOS.

Figura R34.- Estructura química de la 4'-galactosil-lactosa (β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-D-Glcp).

Figura R35.- Perfil cromatográfico obtenido por HPLC-RI de A) el producto comercial VivinalGOS y B) el producto comercial VivinalGOS isomerizado en condiciones básicas con aluminato sódico.

Figura R36.- Estructuras químicas de los isómeros del trisacárido isomerizado.

Figura R37.- Gráficas que representan las variaciones de concentración con el tiempo de los productos formados durante la hidrólisis de la lactulosa con la β -galactosidasa de *A. aculeatus* (Pectinex Ultra SP-L) a tres concentraciones diferentes de lactulosa iniciales (A) 1,3 M (B) 0,7 M y (C) 1,9 M a una temperatura de 60°C. Los símbolos representan los datos experimentales y las líneas continuas, los valores predichos a partir del mejor ajuste obtenido sin la aproximación de estado estacionario.

Figura R38.- Sesibilidad relativa local de los ocho parámetros implicados en el modelo que describe la hidrólisis y transgalactosilación de la lactulosa con la β -galactosidasa de *A. aculeatus* (Pectinex Ultra SP-L) a temperatura constante.

Figura R39.- Matriz de correlación para los ocho parámetros implicados en el modelo que describe la hidrólisis y transgalactosilación de la lactulosa con la β -galactosidasa de *A. aculeatus* (Pectinex Ultra SP-L) a temperatura constante.

Figura R40.- Sesibilidad relativa local de los ocho parámetros implicados en el modelo que describe la hidrólisis y transgalactosilación de la lactulosa con la β -galactosidasa de *K. lactis* (Lactozym 3000L HP G) a temperatura constante.

Figura R41.- Matriz de correlación para los ocho parámetros implicados en el modelo que describe la hidrólisis y transgalactosilación de la lactulosa con la β -galactosidasa de *K. lactis* (Lactozym 3000L HP G) a temperatura constante.

Figura R42.- Gráficas que representan las variaciones de concentración con el tiempo de los productos formados durante la hidrólisis de la lactulosa con la β -galactosidasa de *K. lactis* (Lactozym 3000L HP G) a tres concentraciones diferentes de lactulosa iniciales (A) 0,7 M (B) 1,3 M y (C) 1,9 M a una temperatura de 50°C. Los símbolos representan los datos experimentales y las líneas continuas, los valores predichos a partir del mejor ajuste obtenido sin la aproximación de estado estacionario.

Figura R43.- Gráficas que representan las variaciones de concentración con el tiempo de los productos formados durante la hidrólisis de la lactulosa con la β -galactosidasa de *A. aculeatus* (Pectinex Ultra SP-L) a tres concentraciones de lactulosa (A), (B) y (C) y dos temperaturas (C), (D) y (E). Los símbolos representan los datos experimentales y las líneas continuas, el ajuste con el modelo propuesto.

Figura R44.- Gráficas que representan las variaciones de concentración con el tiempo de los productos formados durante la hidrólisis de la lactulosa con la β -galactosidasa de *K. lactis* (Lactozym 3000L HP G) a tres concentraciones de lactulosa diferentes (A), (B) y (C) y diferentes temperaturas (A) y (D). Los símbolos representan los datos experimentales y las líneas continuas, el ajuste con el modelo propuesto.

Figura R45.- Perfiles obtenidos por HPAEC-PAD de los oligosacáridos con DP ≥ 3 obtenidos por transgalactosilación a partir de lactosa (A) o lactulosa (B) con las β -galactosidasas de *A. Aculeatus* y *K. lactis* y (C) del preparado comercial VivinalGOS.

Figura R46.- Curvas de crecimiento para las cepas bacterianas testadas con los sustratos lactosa, lactulosa, 6'-galactosil-lactosa, 6'-galactosil-lactulosa, 1-galactosil-lactulosa, 4'-galactosil-lactosa y 4'-galactosil-lactulosa.

Figura R47.- Incremento con respecto al tiempo inicial (0 h) de las Bifidobacterias medidas por RT-qPCR en cultivos con muestras fecales obtenidas de 3 donantes, utilizando como fuente de carbono mezclas de GOS purificadas (obtenidas de lactosa y lactulosa), lactulosa, VivinalGOS, lactosa o glucosa después de 8 horas (barras blancas) y 24 h (barras grises) de incubación.

Figura R48.- Fotografías que muestran las poblaciones de *Bifidobacterium* (A), *Clostridium* (B) y *Lactobacillus* (C) obtenidas de los medios conteniendo muestras fecales y los oligosacáridos sintetizados sometidas a un procedimiento FISH para su recuento en el microscopio de fluorescencia.

Figura R49.- Poblaciones bacterianas ($\log 10$ células/mL) a 0, 5, 10 y 24 horas de reacción en fermentaciones en discontinuo con pH controlado para los sustratos a) Lactulosa, b) GOS-3 y c) GOS.4. Las barras representan el error estándar. Letras distintas representan diferencias significativas con respecto al tiempo 0 ($P < 0.05$).

Figura R50.- Poblaciones bacterianas ($\log 10$ células/mL) a 0, 5, 10 y 24 horas de reacción en fermentaciones en discontinuo con pH controlado para los sustratos d) VivinalGOS, e) GOS-1 y f) GOS-2. Las barras representan el error estándar. Letras distintas representan diferencias significativas con respecto al tiempo 0 ($P < 0.05$).

TABLAS

Tabla I1.- Factores que afectan a la fermentación bacteriana en el intestino grueso.

Tabla I2.- Principales grupos bacterianos implicados en la fermentación a nivel intestinal y productos finales originados.

Tabla I3.- Clasificación de ciertos carbohidratos como ingredientes colónicos y prebióticos.

Tabla I4.- Algunas de las preparaciones enzimáticas de β -galactosidasas disponibles comercialmente.

Tabla I5.- Galactooligosacáridos comerciales (Gibson y col., 2000).

Tabla I6.- Técnicas de Biología Molecular que pueden ser aplicadas para el recuento y discriminación bacteriana.

Tabla I7.- Longitudes de onda de emisión y de excitación de tintes fluorescentes para marcar las sondas de oligonucleótidos específicas para ARN_r.

Tabla R1.- Desplazamientos químicos (ppm) obtenidos en los espectros de ^1H (500 MHz) y ^{13}C (125 MHz) y constantes de acoplamiento (Hz) de los principales isómeros de los trisacáridos 1 (pico 5) y 2 (pico 6) en D_2O .

Tabla R2.- Efecto de la adición de monosacáridos en la producción de oligosacáridos y degradación de lactulosa durante la reacción de transgalactosilación a 60°C, durante 6 h de reacción utilizando mezclas de lactulosa (250 g/L) y 16 U/mL de enzima en tampón fosfato 0,1 M pH 6,5.

Tabla R3.- Condiciones óptimas para la síntesis de oligosacáridos derivados de la lactulosa con β -galactosidasa de diferentes orígenes y rendimiento obtenido para los oligosacáridos presentes en la mezcla de reacción.

Tabla R4.- Reutilización de la enzima inmovilizada en glutaraldehído-agarosa. Condiciones de reacción: 450 g/L lactulosa en 0,1 M tampón fosfato (pH 6,5), 16 U/mL y 50°C.

Tabla R5.- Desplazamientos químicos (ppm) para los espectros de ^1H (500MHz) y ^{13}C (125MHz), correspondientes a la 6'-galactosil-lactosa (β -D-Galp(1 \rightarrow 6)- β -D-Galp(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp) purificada mediante HPLC-RI a partir de las mezclas de reacción obtenidas durante la hidrólisis enzimática de la lactosa con las β -galactosidasas de *A. aculeatus* y *K. lactis*.

Tabla R6.- Desplazamientos químicos (ppm) para el espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz) para la alolactosa ($\beta\text{-D-Gal}(1\rightarrow6)\text{-D-Glc}$) y alolactulosa ($\beta\text{-D-Gal}(1\rightarrow6)\text{-D-Fru}$).

Tabla R7.- Desplazamientos químicos (ppm) obtenidos en análisis de RMN de ^{13}C (500 MHz) del trisacárido aislado del VivinalGOS y los de la 4'-galactosil-lactosa reportados en la bibliografía (Onishi y col. 1995).

Tabla R8.- Desplazamientos químicos (ppm) obtenidos en los espectros de ^1H (500 MHz) y ^{13}C (125 MHz) del principal isómero del trisacárido de la mezcla isomerizada VivinalGOS.

Tabla R9.- Valores óptimos de los parámetros estimados para la hidrólisis de la lactulosa y la síntesis de oligosacáridos con la β -galactosidasa de *A. aculeatus* (Pectinex Ultra SP-L).

Tabla R10.- Valores óptimos de los parámetros estimados para la hidrólisis de la lactulosa y la síntesis de oligosacáridos con la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym 3000L HP G).

Tabla R11.- Expresiones obtenidas para las ecuaciones de variación de concentración con el tiempo para la lactulosa, fructosa, galactosa, disacáridos del tipo GalGal, trisacáridos y complejo enzima-galactosa.

Tabla R12.- Valores óptimos de los parámetros estimados para la hidrólisis de la lactulosa y la síntesis de oligosacáridos con las β -galactosidasas de *A. aculeatus* (Pectinex ultra SP-L) y *K. lactis* (Lactozym 3000 L HP G).

Tabla R13.- Constantes de velocidad de la reacción a la temperatura óptima para la formación de trisacáridos con las β -galactosidasas de Pectinex Ultra SP-L (333K) y Lactozym 3000 L HP G (323K).

Tabla R14.- Composición (% de carbohidratos totales) en oligosacáridos con $\text{DP} \geq 3$ de las mezclas de reacción purificadas.

Tabla R15.- Velocidades máximas de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$ en h^{-1}) y tiempo de retardo (Lag time en h) de las bacterias ácido lácticas tras la fermentación con diferentes tipos de oligosacáridos (datos normalizados).

Tabla R16.- Valores de densidad óptica ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) después de 24 y 48 h de crecimiento de las cepas anaeróbicas utilizando como fuentes de carbono lactosa, lactulosa y sus derivados.

Tabla R17.- Concentraciones (mM) de tres de los SCFAs mayoritarios en cultivos fecales de tres donantes utilizando mezclas purificadas de GOS derivados de lactosa y lactulosa, VivinalGOS fraccionado, lactulosa, lactosa y glucosa como fuentes de carbono. *Relación A/P: Relación acético/ propiónico.

Tabla R18.- Cambios en las poblaciones bacterianas (Log 10 Células/mL) de los cultivos fecales *in vitro* tras 10 horas de incubación en presencia de los diferentes substratos e Índice Prebiótico (PI) para dichas muestras.

Tabla R19.- Ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) (mM) producidos tras 10 horas de fermentación con las fracciones de oligosacáridos derivados de lactosa (GOS-1, GOS-3) y lactulosa (GOS-2, GOS-4) y los prebióticos comerciales lactulosa y VivinalGOS (n=3) (A/P =relación ácido acético/ ácido propiónico).

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS EMPLEADOS

En este apartado se detallan las abreviaturas y acrónimos utilizados en esta Memoria, así como sus correspondientes significados. Si bien la mayor parte de términos de origen inglés han sido traducidos al español de acuerdo con las reglas existentes sobre nomenclatura cromatográfica (Ettre, 1995), se han mantenido, en su versión original, aquellos términos o acrónimos cuya traducción al castellano no está suficientemente implantada y cuyo empleo podría dar lugar a confusión.

Acetil-CoA: Acetil coenzima A

ADN: Acido desoxirribonucleico

API-ES: Ionización por presión atmosférica y electrospray

ARN: Acido desoxirribonucleico

BCA: Acido bicinconínico

UFC: Unidades formadoras de colonias

COSY: Correlation spectroscopy

Cy: Cisteína

DAPI: 4,6-Diamidino-2-fenilindol

DO: Densidad óptica

DP: Grado de polimerización

E: Enzima

ESI: Ionización por electrospray

FAB: Ionización rápida por bombardeo atómico

FID: Detector de ionización de llama

FISH: Fluorescencia con hibridación *in situ*

FOS: Fructooligosacáridos

Gal: Galactosa

GC: Cromatografía de Gases

Glc: Glucosa

GOS: Galactooligosacáridos

HMBC: Heteronuclear multiple bond correlation

HMQC: Heteronuclear multiple quantum correlation

HSQC: Heteronuclear simple quantum correlation

HPAEC-PAD: Cromatografía líquida de intercambio aniónico con detección amperométrica de pulsos

HPLC: Cromatografía de líquidos de alta resolución

IUB-IUPAC: International union of biochemistry-International union of pure and applied chemistry

JBC: Joint comission on biochemical nomenclature

Lac: Lactosa

MALDI: Matrix-assisted laser desorption/Ionización

MATLAB: abreviatura de matrix laboratory

MS: Espectrometría de Masas

NADH: Nicotiamida adenina dinucleótido

NADPH: Nicotiamida adenina dinucleótido fosfato

NaoAc: Acetato sódico

NDOs: Oligosacáridos no digeribles

NOESY: Nuclear overhauser effect spectroscopy

ONPG: Orto nitrofenil galactopiranósido

OOS: Otros oligosacáridos

OS: Oligosacáridos

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PEP: Fosfoenol piruvato

PI: Índice Prebiótico

ppm: partes por millón

RFLP: Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción

RMN: Resonancia magnética nuclear

¹³C-RMN: Resonancia magnética nuclear de carbono 13

¹H-RMN: Resonancia Magnética Nuclear de proton

rpm: revoluciones por minuto

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real

RSD: Desviación standard relativa

SCFAs: Ácidos grasos de cadena corta

SSM GO toolbox: ScatterSearch for global optimization in matlab

TOCSY: Total correlation spectroscopy

TOS: Transgalactooligosacáridos

UFC: Unidades formadoras de colonias

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Un alimento funcional se define como aquel que, además de satisfacer las necesidades nutricionales básicas, proporciona beneficios para la salud o reduce el riesgo de padecer enfermedades. Dicho concepto nació en Japón, en los años 80, debido a la necesidad de garantizar una mejor calidad de vida, a la vista de las elevadas inversiones sanitarias originadas por el aumento de la longevidad de la población. En la actualidad, los consumidores están cada vez más concienciados de la relación existente entre la dieta y la salud, lo que ha impulsado el desarrollo y la comercialización de una nueva generación de alimentos con alto valor añadido.

Las múltiples posibilidades de elaboración de alimentos funcionales, basadas en la incorporación a un alimento tradicional de ingredientes con actividad biológica, en la eliminación de constituyentes no deseados o en la modificación de otros, hacen que la gama de productos comercializados actualmente haya aumentado de manera espectacular (Olano y Juárez, 2005).

El aumento en el consumo de alimentos funcionales ha provocado la presencia en el mercado de un gran número de productos e ingredientes alimentarios cuyas propiedades beneficiosas no han sido en todos los casos avaladas científicamente. Dado el vacío legal existente, La UE recientemente ha establecido unas bases legales para controlar su comercialización y así, el consumidor, pueda disponer de toda la información necesaria antes de realizar su elección.

La elaboración de los alimentos funcionales se rige por el Reglamento de la UE: (CE) nº 258/97 y fue puesto en vigor por el Parlamento Europeo el 15 de Mayo de 1997. Dicho reglamento se refiere a nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios, los cuales se definen como “alimentos e ingredientes alimentarios que no han sido usados para el consumo humano de forma significativa dentro de la Comunidad antes de la entrada en vigor de esta ley”. Posteriormente ha sido preciso ir introduciendo nuevas regulaciones que salvaguardaran la seguridad del consumidor, especialmente en lo referido al etiquetado y a las alegaciones nutricionales y de salud. Así, en el año 2000 se introdujo una nueva Directiva (2000/13/EC) sobre el etiquetado de alimentos funcionales cuyo objetivo era garantizar al consumidor toda la información esencial en lo que respecta a la composición del producto, el fabricante, los métodos de almacenamiento y preparación, etc. Dicha directiva prohíbe, además, atribuir a cualquier producto alimenticio la propiedad de prevenir, tratar o curar una enfermedad y hacer referencia a tales propiedades.

Dado que en algunos de los estados miembros se empleaban una gran variedad de alegaciones relativas a determinados ingredientes que han demostrado no ser beneficiosos o sobre las que no existía un consenso científico suficiente, fue necesario establecer una nueva directiva que cubriese esos vacíos legales existentes. De esta manera, en Diciembre de 2006, el Consejo y el Parlamento Europeo establecieron una nueva normativa acerca del uso de alegaciones nutricionales y de salud. Dicho Reglamento establece normas armonizadas para la utilización de alegaciones tales como "bajo contenido de grasa", "alto contenido de fibra" y "ayuda a bajar el colesterol", en base a los perfiles nutricionales de los correspondientes productos alimenticios.

Con esta normativa se pretende no sólo garantizar la seguridad del consumidor, sino también asegurar una competencia justa y promover y proteger la innovación en el ámbito de los alimentos. Sólo podrán referirse a ellos en anuncios publicitarios y en sus etiquetas los productos que ofrezcan auténticos beneficios nutricionales o sobre la salud.

Actualmente, existe una gran variedad de compuestos que tienen una determinada actividad funcional y que podrían utilizarse como ingredientes alimentarios o suplementos dietéticos. Sin embargo, actualmente, son únicamente cinco las categorías en las que se clasifican: fitoquímicos, probióticos, prebióticos, ácidos grasos poliinsaturados y péptidos/proteínas bioactivas (Xu y col., 2001). De todos ellos, uno de los grupos que ha suscitado especial interés en los últimos años es el de los prebióticos, ya que están relacionados con la función gastrointestinal y una gran sector de la población está afectado por problemas relacionados con la misma (Saarela y col., 2002).

El conocimiento de la composición y actividad de la microbiota intestinal es muy importante para poder conocer el efecto que estos ingredientes ejercen sobre el organismo,

1.1. MICROBIOTA INTESTINAL

La microbiota intestinal desarrolla una intensa actividad metabólica que le permite mantener una relación de simbiosis o comensalismo con el huésped. La actividad bioquímica microbiana actúa colectivamente como un órgano, interviniendo en: la mejoría de la biodisponibilidad de nutrientes y la degradación de compuestos de la dieta no digeribles; el aporte de nuevos nutrientes, y la eliminación de compuestos perjudiciales y antinutrientes. Estas funciones metabólicas tienen una gran repercusión en el estado nutritivo y de salud del

hombre; no obstante, dependen de la composición de la flora y de sus complejas interacciones con la dieta y el individuo.

1.1.1. Composición de la microflora

Las bacterias que habitan el tracto gastrointestinal humano constituyen un verdadero ecosistema que va variando en cada tramo del intestino, tanto en número como en composición de las especies que lo constituyen (Figura I1).

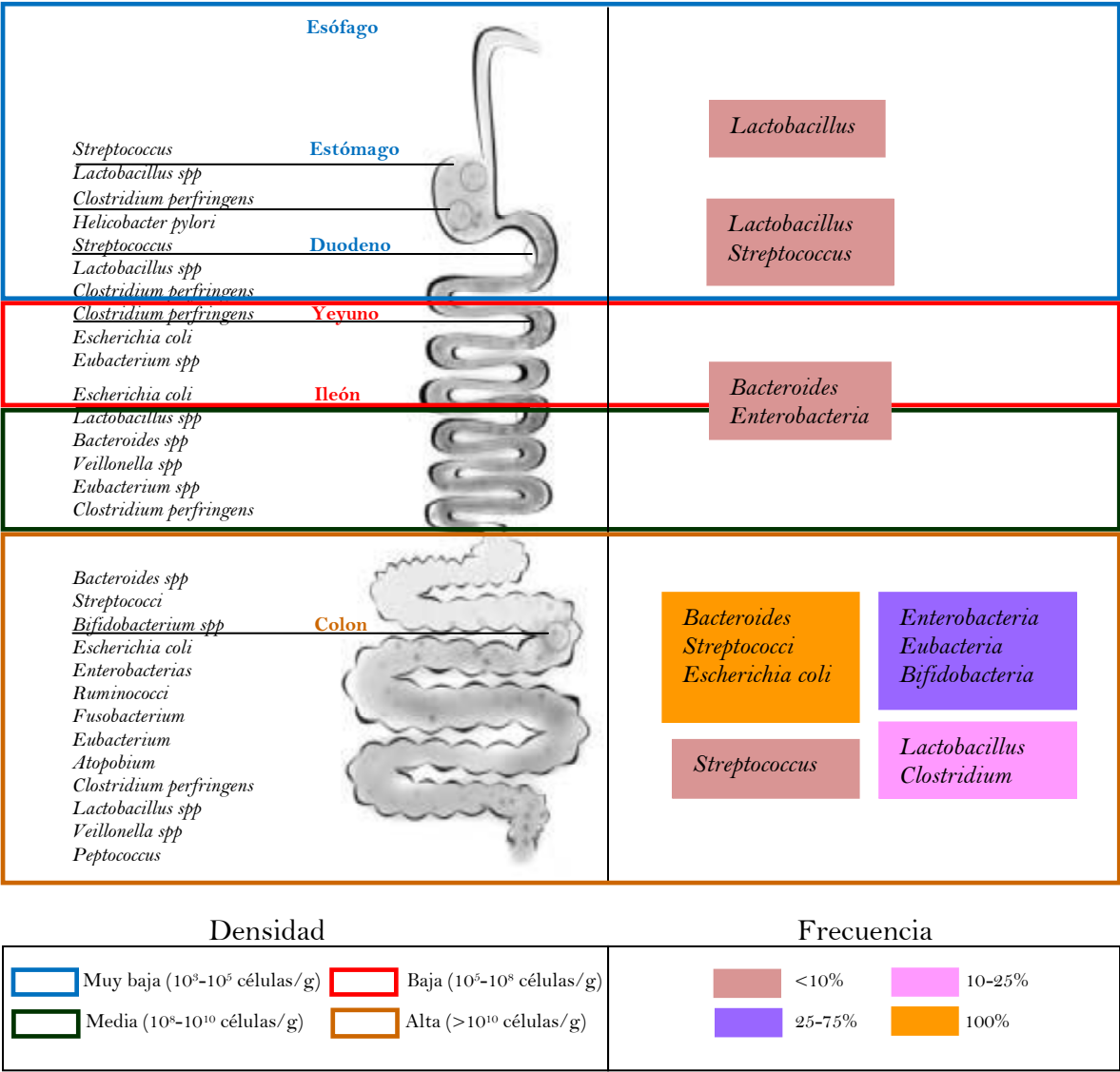


Figura I1.— Distribución y composición de las diferentes especies bacterianas en el tracto gastrointestinal.

En los tramos intestinales altos, el pH es bastante ácido por lo que la colonización es similar a la del estómago; según se avanza en el intestino delgado, disminuye la acidez debido a la dilución de los ácidos y a la presencia de sales biliares, lo que facilita la colonización bacteriana, que aumenta claramente en el colon dando lugar a que más de la tercera parte del contenido en materia seca de las heces sean bacterias.

De todas estas especies bacterianas unas son beneficiosas y otras patógenas, por lo que la actividad metabólica de las mismas puede tener un efecto tanto positivo como negativo en nuestra salud. Es obvio que mantener un balance adecuado en el ecosistema siempre a favor de las bacterias beneficiosas es fundamental para nuestro organismo. Las bacterias indeseables incluyen, entre otras, especies del género *Clostridium* y *Veillonella*. Estas especies originan sustancias potencialmente perjudiciales tales como productos putrefactivos, toxinas y carcinógenos (Gibson y Roberfroid, 1995) que pueden causar efectos como diarrea, infecciones, daño en el hígado, carcinogénesis y putrefacción intestinal (Gibson, 1998). Las bacterias beneficiosas incluyen principalmente especies del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* y juegan papeles básicos en funciones nutricionales y de prevención de enfermedades. En la Figura I2 se muestra la clasificación de estas especies en función del tipo de efecto que ejercen sobre la salud.

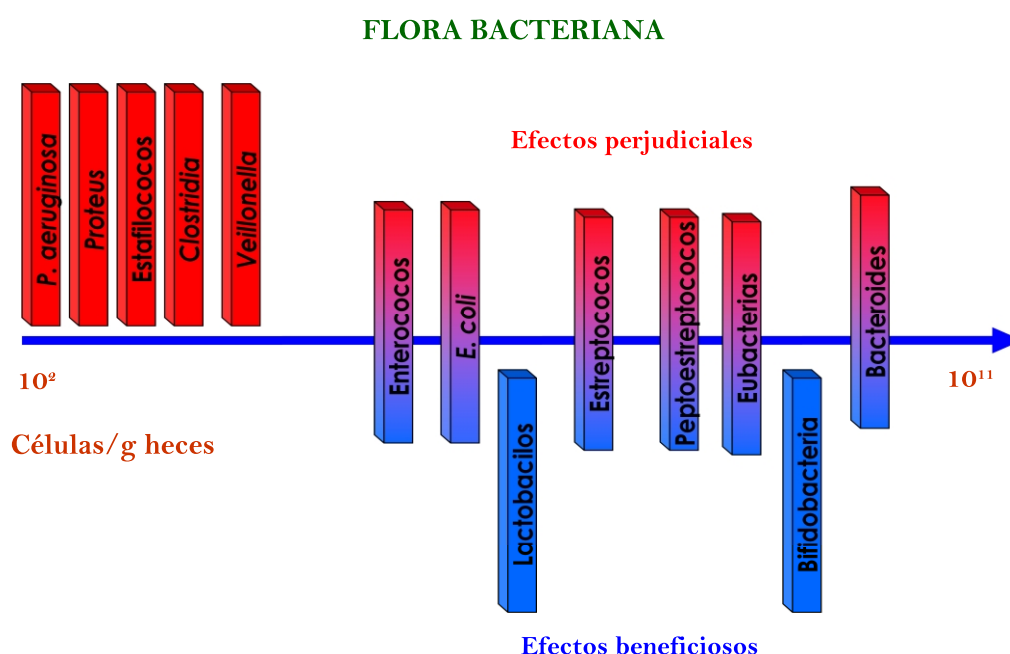


Figura I2.- Clasificación de la flora bacteriana en función de sus efectos beneficiosos y perjudiciales sobre la salud (Gibson y Roberfroid, 1995, modificada).

La colonización del tracto gastrointestinal comienza en el momento del nacimiento. Así, las bacterias procedentes de la flora intestinal y vaginal materna colonizan el tracto gastrointestinal del recién nacido, dando lugar a una flora intestinal muy diversa (bifidobacterias, enterobacterias, bacteroides, clostridias y cocos gram-positivos) (Heine, 1998; Heine y col., 1998a) que puede verse influenciada por muchos factores tales como el tipo de parto y, posteriormente, el tipo de lactancia. Estas primeras bacterias intestinales pueden modular la expresión de genes de las células intestinales del huésped de modo que favorezcan el crecimiento de ellas mismas e impidan el de otras, por lo que la colonización inicial puede condicionar la composición final de la flora en el adulto.

En los niños nacidos por parto vaginal, hay un predominio de anaerobios procedentes de la madre (sobre todo, bacteroides) y, en los nacidos por cesárea, se ha observado un tipo de flora diferente a la de la madre y un retraso en la colonización (Grönlund y col., 1999; Penders y col., 2006). En condiciones normales, la flora, estable y heterogénea, debe quedar ya establecida a los 10 días de vida del recién nacido (Heine y col., 1998; Gewolb y col., 1999); sin embargo, estudios científicos han demostrado que, en niños nacidos por cesárea, a los seis meses de vida la colonización bacteriana aún es insuficiente (Grönlund y col., 1999).

En cuanto al tipo de lactancia, se ha observado que en el intestino de los niños alimentados con leche materna, mucho más resistentes a las alergias e infecciones, predominan las bifidobacterias y lactobacilos con una relación 1000:1 frente a las enterobacterias. Sin embargo, en el intestino de los niños alimentados con fórmulas infantiles hay un predominio de enterobacterias sobre las bifidobacterias en una relación de 10:1. El niño con lactancia artificial tiene un predominio de bacteroides, clostridias y enterobacterias, siendo la flora más diversa y menos estable (Vitoria Miñana, 2007).

Desde finales de los años 50 ya se sabía que, de todos los componentes de la leche materna, son los oligosacáridos los que favorecen el desarrollo de una flora constituida mayoritariamente por bifidobacterias (Kunz y Rudloff, 2006). Hoy en día, ya se conoce que la leche materna contiene más de 130 oligosacáridos distintos, que constituyen, después de la grasa y la lactosa, el tercer componente de la misma (Bode, 2006; Vitoria Miñana, 2007). Es por ello que se ha intentado asemejar las fórmulas infantiles a la de la leche materna basándose en el tipo de compuestos que la constituyen.

A partir del momento del destete, la introducción de alimentación complementaria con alimentos de todo tipo, condiciona la microflora intestinal

que, progresivamente, va adquiriendo el perfil de los adultos hasta alcanzar los dos años de edad que es cuando se constituye definitivamente (Mackie, 1999).

1.1.2. Actividad

El tránsito de los alimentos a través del estómago y del intestino delgado, es demasiado rápido como para que la microflora existente en estos órganos ejerza un impacto importante en el organismo humano, sin embargo, en el colon sucede todo lo contrario, siendo el tiempo medio de permanencia de los restos alimenticios alrededor de 70 horas. Debido a esto, la microflora del colon tiene la oportunidad de degradar los sustratos disponibles, bien derivados de la dieta o por secreción endógena de los propios microorganismos (Cummings y McFarlane, 1991). La utilización de los sustratos que no han sido digeridos en el intestino delgado para obtener energía, se denomina fermentación, y es un proceso anaeróbico que se ve influido por una gran variedad de factores físicos, químicos, biológicos y ambientales (ver Tabla I1).

Tabla I1.- Factores que afectan a la fermentación bacteriana en el intestino grueso (Gibson y col., 2000).

-
- Composición química del sustrato
 - Cantidad de sustrato disponible para la fermentación
 - Forma física del sustrato
 - Tiempo del tránsito en el colon
 - Composición de la flora bacteriana: diversidad en las especies y número relativo de los diferentes tipos de bacterias
 - Interacciones competitivas y cooperativas entre bacterias
 - Velocidad de despolimerización del sustrato
 - Especificidad del sustrato
 - Estrategias de fermentación de los sustratos por las bacterias
 - pH
 - Uso de antibióticos
-

Los principales sustratos disponibles para la fermentación colónica son los almidones y fibras dietéticas tales como las pectinas y los xilanos, que son resistentes a la acción de amilasas pancreáticas y pueden ser degradados por las enzimas bacterianas. Otros carbohidratos, aunque en una menor proporción, también alcanzan esta región actuando como sustratos para las bacterias. Por otro lado, las proteínas y los aminoácidos también pueden ser utilizados por las bacterias del colon, mientras que las secreciones bacterianas, los productos de la lisis celular, las células epiteliales muertas y las mucinas pueden tener una pequeña contribución. Pero, sin ninguna duda, la dieta es la que proporciona la mayor parte de nutrientes, originando aproximadamente 70 g/día de residuos

dietéticos, que están totalmente disponibles para la microflora colónica. Estos materiales se degradan mediante la acción de glicosidasas bacterianas, proteasas y amino peptidasas a oligómeros más pequeños, monosacáridos y aminoácidos (Gibson y Macfarlane, 1995). Así, los carbohidratos son fermentados (Figura I3) por bacterias sacarolíticas situadas principalmente en el colon proximal, produciendo ácidos grasos de cadena corta (SCFAs), CO₂ y H₂ (Macfarlane y Macfarlane, 2003), lo cual puede alterar la fisiología colónica. La fermentación de las proteínas y los aminoácidos por bacterias proteolíticas liberan SCFAs ramificados, CO₂, CH₄, H₂, fenoles y aminas (Roberfroid, 2005). Los principales efectos de los SCFAs en la función colónica son el resultado de su absorción y metabolismo por los colonocitos, aunque también pueden ser utilizados por otro tipo de tejidos. La producción de SCFAs viene determinada por muchos factores, incluyendo el número y tipo de microorganismos presentes en el colon (Roberfroid, 2005), la fuente del sustrato (Cook y Sellin, 1998), y el tiempo de tránsito intestinal.

1.1.2.1. Ácidos grasos de cadena corta (SCFAs)

Los SCFAs son ácidos orgánicos que contienen de 1 a 6 átomos de carbono y son los principales aniones que se originan de la fermentación bacteriana. Los principales SCFAs producidos de la fermentación de los carbohidratos son acetato, propionato y butirato (Cummings, 1995). Valerato, hexanoato, isobutirato e isovalerato también se forman en el colon pero en mucha menor proporción (5-10% del total de los SCFAs) (Figura I3).

El ácido láctico es un producto intermedio de la fermentación de los carbohidratos y se acumula solamente cuando se inhibe la producción de SCFAs en un medio ácido inferior a pH 5,5 (Soergel, 1994).

Los SCFAs son rápidamente absorbidos en el ciego y el colon, excretándose solo un 5% y un 10% en las heces. La proporción relativa de la forma ionizada (A⁻) y protonada (AH) de los SCFAs viene determinada por el pH. La forma protonada es liposoluble y difunde rápidamente dentro de la célula, sin embargo la forma ionizada no es liposoluble y tiene que seguir otras vías para poder ser absorbida por el epitelio. Al igual que todos los electrolitos débiles, el equilibrio HA/A⁻ depende del pH y ligeras variaciones pueden provocar cambios en el paso de los SCFAs a través de las membranas. A pH fisiológico, aproximadamente un 1% de los SCFAs están en la forma protonada.

El mecanismo de absorción de los SCFAs puede ser por 1) difusión de los SCFAs protonados (al menos un 60%) ó 2) por intercambio aniónico (Cook y

Sellin, 1998), estando dicha absorción relacionada con el transporte de agua que parece ser mayor en las regiones distales del colon

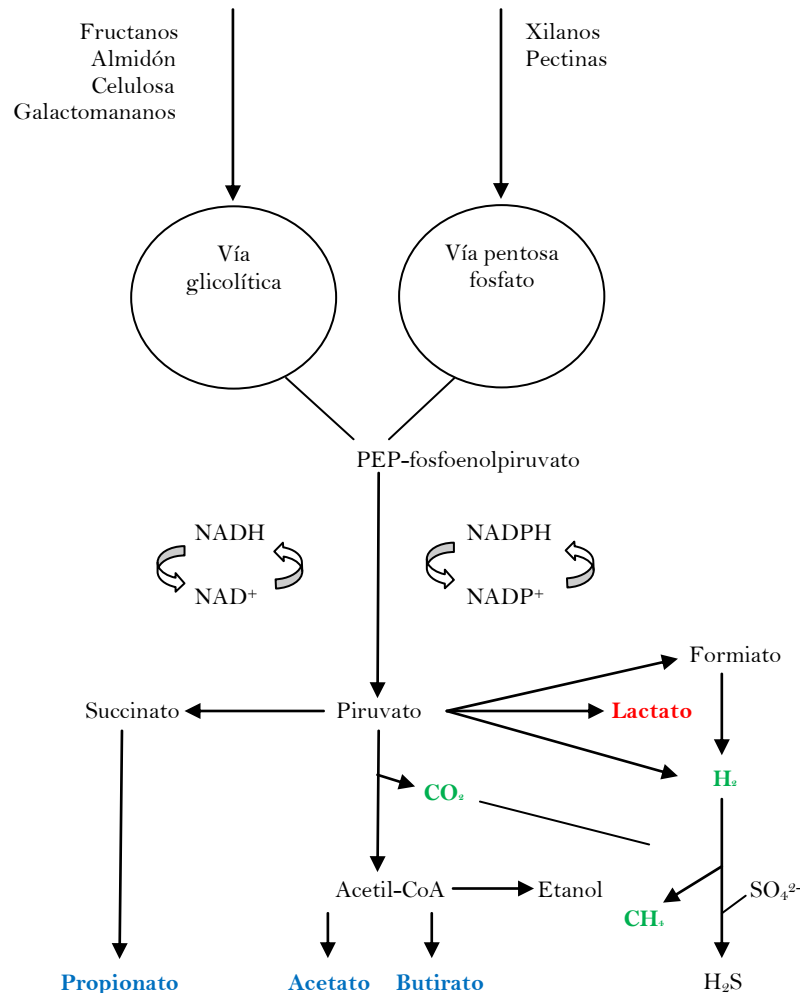


Figura I3.- Principales vías de producción de los SCFAs y otros metabolitos, por fermentación bacteriana, en el lumen del colon (Macfarlane y Gibson, 1996).

El acetato es el mayor SCFA producido siendo la relación molar acetato:propionato:butirato, aproximadamente 60:20:20. En estudios llevados a cabo con humanos, el acetato se utiliza a menudo para monitorizar lo que sucede en el colon puesto que es el principal SCFA presente en la sangre siendo el principal sustrato para la síntesis del colesterol. Además, en el tracto gastrointestinal, puede ser utilizado por tejidos periféricos (Pomare y col., 1985) y por bacterias para producir butirato en el colon (Duncan y col., 2002).

La mayor parte de los conocimientos acerca del propionato proceden de estudios llevados a cabo en rumiantes. En estos animales, la absorción de glucosa

en el intestino es mínima debido a la presencia de una microflora intestinal adecuada para la digestión y fermentación de carbohidratos. La producción de SCFAs constituye la mayor fuente de energía en los rumiantes, siendo el propionato el principal precursor para la gluconeogénesis. El metabolismo del propionato en los humanos es mucho menos conocido, pero el aumento de su producción a través de la fermentación se asocia con una disminución de lípidos en sangre y con la inhibición de la síntesis de colesterol en el hígado. Por ello, la relación propionato/acetato parece determinante en la acción de dichos SCFAs sobre los lípidos séricos puesto que dicha relación es la responsable de la mayor o menor producción de colesterol (Cheng y Lai, 2000; Wolever y col., 1996).

En cuanto al butirato, este ácido graso es la principal fuente de energía para las células epiteliales del colon, a diferencia de lo que ocurre en el intestino delgado, donde la mayor fuente de energía es la glutamina. Entre un 70 y un 90% del butirato se metaboliza por los colonocitos (Zoran y col, 1997; Basson y col., 2000; Della Ragione y col., 2001) y está implicado en el control de todos los mecanismos que controlan la apoptosis, división y proliferación celular (Shiavoshian y col., 2000). Además, el butirato sódico ejerce una actividad antiproliferativa en muchos tipos de células, lo que ha demostrado su efecto preventivo en el cáncer de colon y el desarrollo de adenomas (Bornet y col., 2002).

Además de los SCFAs, en el proceso de fermentación, como ya se ha indicado anteriormente, también tiene lugar la producción de gases, concretamente H_2 y CO_2 . La mayor parte del H_2 es convertido a metano por parte de las bacterias, y ambos, tanto el metano como el H_2 son liberados por la respiración y los flatos. La producción de gases, especialmente si es rápida, es una de las principales desventajas cuando se ingieren alimentos con un elevado contenido en sustratos fermentables.

De manera general, los productos finales de un proceso de fermentación sacarolítico se consideran beneficiosos para el organismo mientras que los metabolitos resultantes de la fermentación de las proteínas y/o aminoácidos, tales como aminas, amonio y compuestos fenólicos, se consideran perjudiciales para el tracto gastrointestinal. A continuación, en la Tabla I2 se muestra una relación entre los productos finales de la fermentación y los grupos bacterianos implicados en su producción.

Tabla 12.- Principales grupos bacterianos implicados en la fermentación a nivel intestinal y productos finales originados.

Grupo bacteriano	Producto final
Bacteroides, bifidobacterias, eubacterias, lactobacilos, clostridias, ruminococos, peptococos, veillonellas, peptostreptococos, propionibacterias, fusobacterias, butirivibrios	Acetato
Bacteroides, propionibacterias, fusobacterias, butirivibrios.	Propionato
Clostridias, fusobacterias, butirivibrios, eubacterias, peptoestreptococos	Butirato
Bacteroides, bifidobacterias, lactobacilos, eubacterias, peptoestreptococos, clostridias, ruminococos, fusobacterias, actinomicetes, enterococos	Lactato
Clostridias, ruminococos, fusobacterias	H ₂

Debido a la complejidad del ecosistema microbiano en el tracto gastrointestinal humano y, concretamente, en el colon, resulta interesante intentar conseguir, a través de la dieta, una flora bacteriana donde las bacterias beneficiosas sean el grupo predominante. Existen dos vías para incrementar el número de microorganismos beneficiosos: 1) por administración oral de alimentos con bacterias vivas beneficiosas llamados probióticos ó 2) proporcionándoles a las bacterias beneficiosas fuentes de carbono y energía con componentes dietéticos selectivos. Estos últimos son los que se conocen con el nombre de PREBIOTICOS. Prebióticos y probióticos pueden ser suministrados conjuntamente recibiendo los productos resultantes el nombre de simbióticos (Crittenden, 1999).

En el caso de los probióticos el principal inconveniente que presentan es, que sólo una pequeña proporción de las bacterias ingeridas alcanzan el intestino grueso intactas. Además, aunque consigan instalarse por adherencia al epitelio

intestinal, tienen que competir con las especies bacterianas, ya existentes en el colon, por los nutrientes y los sitios de colonización. Por ello, es muy difícil prever si las cepas seleccionadas para ser consumidas oralmente son efectivas, cómo pueden sobrevivir y cuánto tiempo pueden permanecer activas en el colon (Swennen y col., 2006).

Los prebióticos son compuestos que resisten las condiciones de la zona alta del tracto gastrointestinal, alcanzando el colon donde pueden modificar la microflora, de manera que potencien selectivamente la proliferación de los organismos beneficiosos. Las principales diferencias entre probióticos y prebióticos se muestran de modo esquemático en la Figura I4.

ALIMENTOS FUNCIONALES

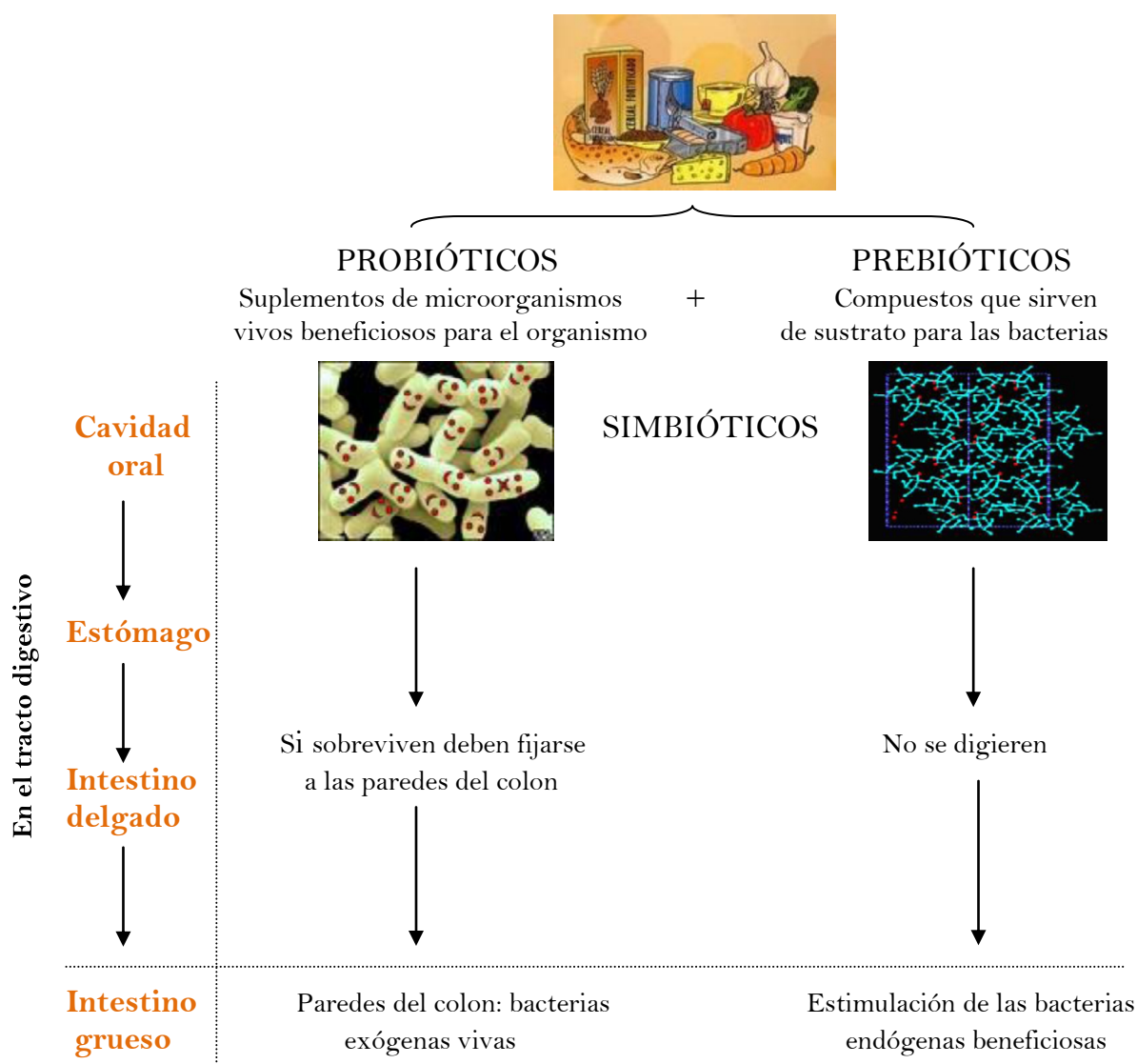


Figura I4.- Esquema simplificado de las principales diferencias entre probióticos y prebióticos.

1.2. PREBIÓTICOS

El término prebiótico, fue establecido por Gibson y Roberfroid quienes lo definieron por primera vez, en 1995, como ***“un ingrediente alimentario no digerible que es capaz de alcanzar el colon sin ser hidrolizado ni absorbido en la parte más alta del tracto gastrointestinal. El aspecto clave reside en su selectividad para promover el crecimiento de bacterias beneficiosas tales como bifidobacterias y lactobacilos a expensas de otras indeseables tales como clostridia”***. En la Figura I5 se muestran las 3 condiciones que debe cumplir un ingrediente en el tracto gastrointestinal para ser considerado como prebiótico.

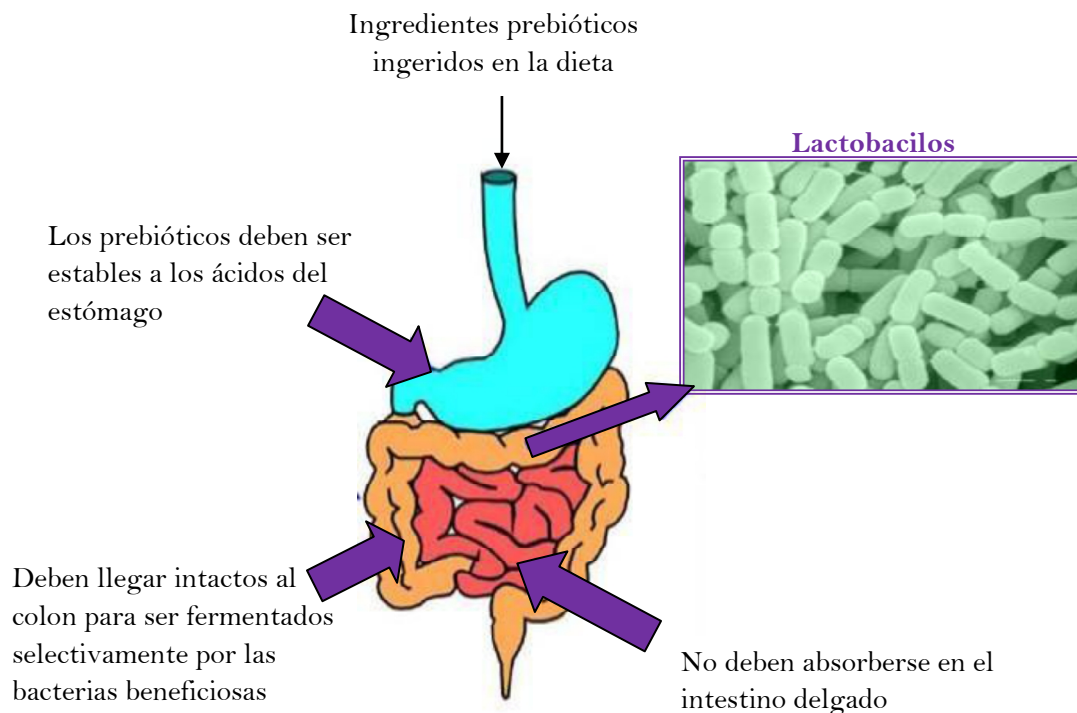


Figura I5.- Condiciones que han de cumplir los ingredientes en el tracto gastrointestinal para ser considerados como prebióticos (Tuohy y col., 2005).

Debido a los avances científicos que han tenido lugar durante los últimos años sobre prebióticos y sobre la ampliación de sus efectos beneficiosos en la salud, los autores de esta primera definición de prebióticos revisaron su concepto original para proponer uno nuevo. De esta manera, ***“un prebiótico es un ingrediente***

que al ser fermentado selectivamente da lugar a cambios específicos tanto en la composición como en la actividad de la microflora intestinal confiriendo beneficios tanto en la salud como en el bienestar del individuo” (Gibson y col., 2004).

Un compuesto capaz de alcanzar las porciones distales del intestino es un buen candidato a ser considerado como prebiótico. Así, materiales biológicamente complejos como los hidrolizados de caseína bovina, el extracto de levadura, algunos amino-azúcares y péptidos pueden mejorar tanto el crecimiento de bifidobacterias como de lactobacilos (Stanton y col., 2003). Aunque no se conoce cuál es el papel que desempeñan en la fermentación bacteriana, en algunos casos, la proteólisis anaeróbica puede originar sustancias potencialmente perjudiciales tales como amonio, aminas (Macfarlane y Cummings, 1991).

De entre todos los ingredientes alimentarios, los carbohidratos no digeribles (oligo- y polisacáridos) son los candidatos más importantes para ser prebióticos. Debido a su estructura química, estos compuestos no se absorben en la parte alta del tracto gastrointestinal ni son hidrolizados por las enzimas digestivas humanas, por lo que son considerados como “ingredientes colónicos”. Es decir, que llegan al colon y sirven como sustrato para las bacterias colónicas endógenas y así, indirectamente, originan energía, sustratos metabólicos y micronutrientes necesarios para el huésped.

Existen oligosacáridos que cumplen estos requisitos y además estimulan el crecimiento selectivo de determinadas especies de la flora intestinal, fundamentalmente beneficiosas, por lo que además de ser colónicos son ingredientes prebióticos. En la Tabla I3 puede observarse la clasificación de los carbohidratos con propiedades colónicas y/o prebióticas.

Tabla I3.- Clasificación de ciertos carbohidratos como ingredientes colónicos y prebióticos.

Carbohidrato	Ingrediente colónico	Prebiótico
Almidón resistente	Sí	No
Polisacáridos:		
-Polisacáridos estructurales	Sí	No
-Hemicelulosas	Sí	No
-Pectinas	Sí	No
-Gomas	Sí	No
Oligosacáridos no digeribles:		
-Fructooligosacáridos	Sí	Sí
-Galactooligosacáridos	Sí	Sí
-Lactulosa	Sí	Sí
-Oligosacáridos de la soja	Sí	?
-Glucooligosacáridos	Sí	No
-Arabinooligosacáridos	Sí	?

1.2.1. Oligosacáridos como prebióticos

Los oligosacáridos son carbohidratos cuyo grado de polimerización varía, según la IUB-IUPAC (IUB-IUPAC; Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JBC) ,1980), entre 3 y 10 unidades, aunque, los oligosacáridos también se han definido en la bibliografía como carbohidratos con un grado de polimerización de 2 hasta 20 unidades (British Nutrition Foundation, 1990; Kunz y col., 2000). Por otro lado, Van den Broek (1993) y Cummings y col., (1997) clasificaron los oligosacáridos, desde un punto de vista fisiológico, en digeribles o no digeribles (NDOs). En la Figura I6 se muestra un esquema de las diferentes rutas que siguen tanto los oligosacáridos digeribles como los no digeribles cuando son introducidos en el organismo mediante la ingestión de alimentos.

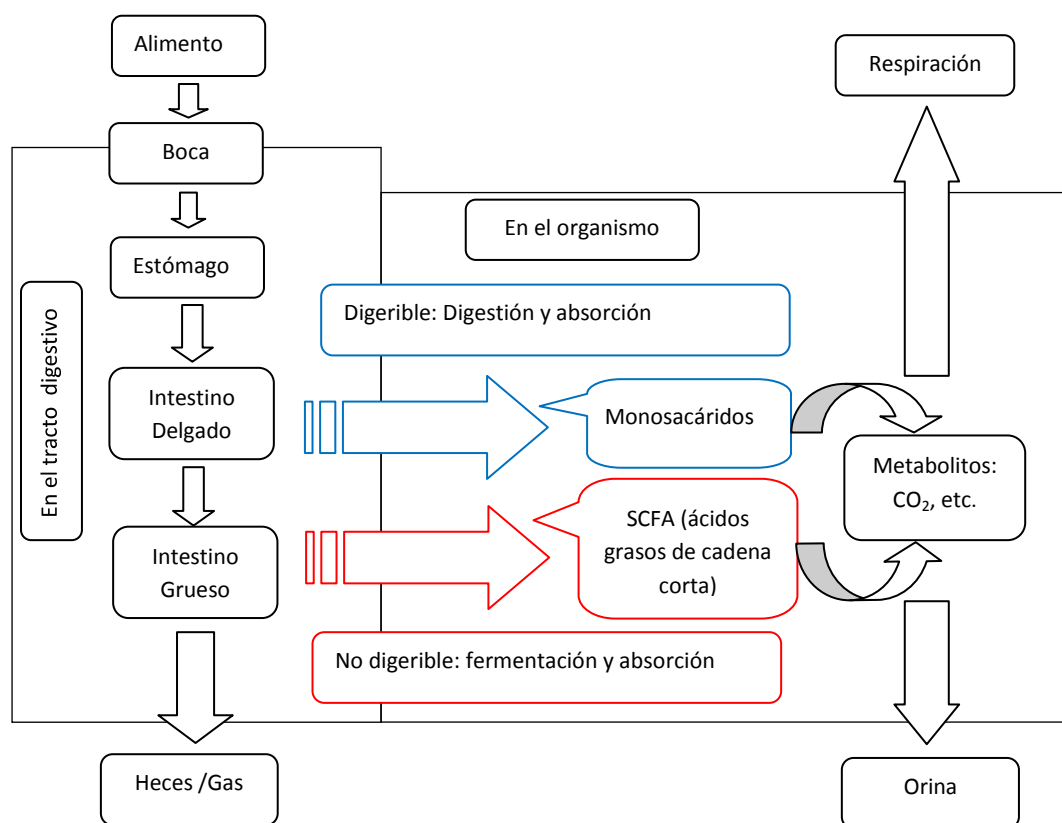


Figura I6.- Esquema de las principales diferencias en las vías metabólicas de los oligosacáridos digeribles y los no digeribles (Hirayama, 2002).

La velocidad a la cual se fermentan los NDOs en el intestino depende de una serie de factores tales como, el grado de polimerización, el enlace glicosídico, el grado de ramificación, los monómeros que estén formando parte de la estructura, la relación sustrato-bacteria, los productos de fermentación, etc.

Los NDOs, pueden encontrarse de forma natural en muchos alimentos como las frutas, las hortalizas, los cereales, las legumbres (Kuo y col., 1988), la miel (Swallow y Low, 1990) y la leche (Voragen 1998, Alander y col., 2001). Sin embargo, estos alimentos no siempre se ingieren en cantidades suficientes para que, los oligosacáridos que se encuentran en ellos ejerzan su posible efecto prebiótico. Por lo tanto, a veces, es necesaria la fortificación de alimentos, frecuentes en nuestra dieta, con este tipo de compuestos. Los oligosacáridos que se emplean con este fin, se obtienen por extracción de fuentes naturales (por ejemplo, la rafinosa de plantas), por hidrólisis de polisacáridos (fructooligosacáridos de la inulina) o a través de reacciones enzimáticas (GOS por transglicosilación). La Figura I7 muestra los distintos procesos industriales de obtención de NDOs. Las diferencias químicas entre estos oligosacáridos radica en

la longitud de la cadena, composición en monosacáridos, grado de ramificación y pureza.

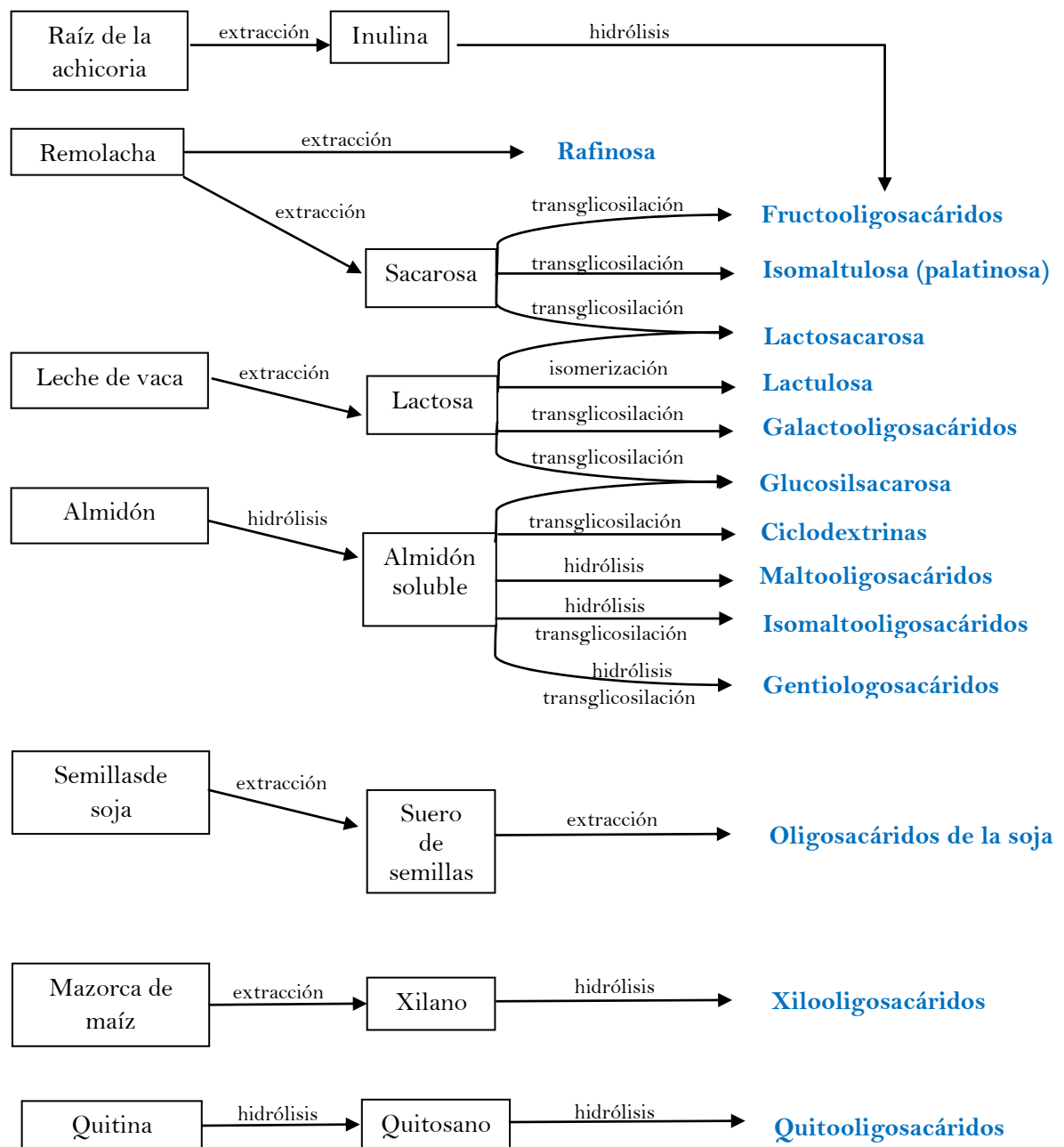


Figura 17.- Representación esquemática de la producción de los oligosacáridos no digeribles (Sako y col., 1999, modificado)

De entre todos estos NDOs hoy en día, la lactulosa, los fructooligosacáridos (FOS) y los galactooligosacáridos (GOS) son considerados prebióticos y, aunque existen muchos estudios sobre otros oligosacáridos que demuestran sus efectos

beneficiosos sobre el crecimiento de la flora intestinal beneficiosa, éstos no son tan extensos ni tan completos.

1.2.1.1. Propiedades fisicoquímicas

Los oligosacáridos prebióticos poseen las mismas propiedades físicoquímicas que el resto de oligosacáridos, lo que favorece su incorporación a los alimentos. Son solubles en agua y de 0,3 a 0,6 veces menos dulces que la sacarosa. El poder edulcorante depende de su estructura química, el grado de polimerización y de la presencia de mono- y disacáridos (Crittenden y Playne, 1996; Voragen, 1998). Así, de acuerdo con Roberfroid y Slavin (2000), el poder edulcorante disminuye con la longitud de la cadena de los oligosacáridos, lo que los hace apropiados para su utilización en determinados alimentos donde el poder edulcorante de la sacarosa resulta excesivo. La utilización de los oligosacáridos prebióticos solos o con edulcorantes artificiales puede enmascarar o eliminar los sabores desagradables de los mismos. Además, comparándolos con mono- y disacáridos, el mayor peso molecular da lugar a un incremento de la viscosidad mejorando el cuerpo y la palatabilidad del producto (Crittenden y Playne, 1996).

La estabilidad de los oligosacáridos depende del tipo de monosacáridos que presente su estructura, de la forma del anillo, de la configuración anomérica y de los tipos de enlace. Así, los enlaces β son generalmente más fuertes y las hexosas están más fuertemente unidas que las pentosas. Únicamente con tratamientos ácidos ($\text{pH} < 4$), elevadas temperaturas o un prolongado almacenamiento a temperatura ambiente, los oligosacáridos presentes en los alimentos pueden ser hidrolizados dando lugar a pérdidas, no sólo de sus propiedades físico-químicas (Voragen, 1998), sino también de sus propiedades fisiológicas.

Debido a su alta capacidad para retener la humedad, los oligosacáridos también pueden emplearse para disminuir la temperatura de congelación y para controlar el pardeamiento no enzimático derivado ó provocado durante la reacción de Maillard en los alimentos procesados, evitando un secado excesivo del producto al que se le añaden (Nakakuki, 1993; Crittenden y Playne, 1996). Además, pueden emplearse como espesantes. Poseen baja cariogenicidad, a diferencia de los azúcares sencillos y del almidón, ya que la microflora de la boca no utiliza a los oligosacáridos para formar ácidos o poliglucanos. Son apropiados para los diabéticos debido a su bajo contenido calórico porque al no digerirse en el intestino delgado, evitan el aumento de glucosa en suero. El valor calórico de los NDOs se estima que es alrededor de 1,5-2,0 kcal/g, lo que constituye

aproximadamente un 40-50% de lo que aportan carbohidratos digeribles tales como la sacarosa (Sako y col., 1999).

1.2.1.2. Propiedades fisiológicas

La fermentación de los oligosacáridos prebióticos en el colon por las bacterias puede causar los siguientes efectos beneficiosos en la salud:

-Modificación de la flora bacteriana. Favorecen la proliferación de las bacterias conocidas como beneficiosas (bifidobacterias y lactobacilos) la cuales generan SCFAs produciéndose como consecuencia un descenso de pH que a su vez inhibe el crecimiento de la flora patógena (Mussato y Mancilha, 2007).

-Producción de nutrientes. El género *Bifidobacterium* favorece la síntesis de vitaminas de tipo B (B1, B2, B6 y B12, ácido nicotínico y ácido fólico) (Gibson y Roberfroid, 1995; Kasper, 1996), aunque no se sabe la biodisponibilidad de estas vitaminas (Vitoria Miñana, 2007).

-Aumento de la movilidad intestinal e incremento de la excreción fecal. La ingestión de oligosacáridos prebióticos previene el estreñimiento y tiene efectos similares a la ingesta de fibra alimentaria. Los productos finales de la fermentación, los SCFAs, son eficazmente absorbidos y utilizados por las células epiteliales del colon, estimulando su crecimiento así como la absorción de agua y sales e incrementando la humedad del bolo fecal mediante presión osmótica, lo cual mejora el movimiento intestinal. Además, la ingesta diaria de FOS (Tungland y col, 2002) y lactulosa (Marteau, 2001) incrementa la masa microbiana y la producción de gases, lo que provoca un aumento de la masa del bolo fecal. Este hecho estimula el paso a través del colon reduciéndose el tiempo de tránsito y la posibilidad de la reabsorción de agua.

-Efecto protector frente a infecciones en el tracto gastrointestinal, respiratorio y urogenital. Son varios los mecanismos por los cuales las bacterias productoras de ácido láctico pueden reducir las infecciones. El primero de ellos se encuentra relacionado con la bajada de pH que se origina como consecuencia de la producción de SCFAs, condiciones desfavorables para los organismos patógenos. Además, muchas especies de lactobacilos y bifidobacterias son capaces de excretar antibióticos naturales con un amplio espectro de acción. Otros mecanismos incluyen una mejora de la respuesta inmune, la competición por los nutrientes y el bloqueo de los sitios de adhesión de los patógenos a la superficie epitelial en el tracto gastrointestinal. Por ejemplo, muchos patógenos intestinales como

Escherichia, *Salmonella* y *Campylobacter* utilizan sitios receptores de oligosacáridos, donde, una vez establecidos pueden causar la infección por invasión o por generación de toxinas. Los oligosacáridos prebióticos pueden ser utilizados para simular esos puntos receptores y “engañar” al patógeno que, de este modo, no se uniría a la superficie epitelial (Gibson y col., 2005).

-Incremento en la absorción de minerales. Los oligosacáridos prebióticos tienen la capacidad de enlazarse o “secuestrar” hierro, calcio y magnesio (Roberfroid y Delzenne, 1998; Brandt, 2001; Manning y Gibson, 2004; Hirayama, 2002), impidiendo su absorción en el intestino delgado para alcanzar el colon donde son liberados y, posteriormente, absorbidos. Además, algunas investigaciones sugieren que la producción de SCFAs, especialmente de butirato, al estimular el crecimiento de las células epiteliales del colon, incrementa la capacidad de absorción del epitelio (Scholz-Arens y col., 2001). El consumo de oligosacáridos prebióticos sería así, de especial relevancia para ancianos y mujeres postmenopáusicas previniendo el riesgo de osteoporosis y anemia. El incremento en la absorción de calcio, por ejemplo, ayudaría a mejorar la densidad y la masa ósea. El incremento en la absorción de calcio ha sido demostrada utilizando fructanos (Hirayama, 2002), GOS (Sako y col., 1999) y lactulosa (Scholz-Ahrens y col., 2001) en adolescentes y/o mujeres postmenopáusicas.

-Mejora del metabolismo de lípidos. Los oligosacáridos prebióticos reducen los niveles de colesterol, triglicéridos y fosfolípidos en la sangre minimizando así el riesgo de padecer diabetes y obesidad. Algunas cepas de *Lactobacillus acidophilus* asimilan el colesterol presente en el medio, mientras que otras cepas parecen inhibir la absorción del mismo a través de la pared intestinal. Por otro lado, los cambios en el metabolismo lipídico pueden ser una consecuencia de la producción de SCFAs, los cuales pueden provocar en el hígado cambios metabólicos (Conway, 2001).

-Reducción del riesgo de padecer cáncer. Este efecto parece estar asociado al incremento de las bacterias beneficiosas y de los SCFAs durante la fermentación de los oligosacáridos prebióticos. Parámetros fisiológicos como el aumento de pH, la concentración de amonio, p-cresol e indol son considerados no sólo como factores de riesgo para el desarrollo de cáncer de colon sino también para otros desórdenes sistémicos. Estudios en humanos han demostrado que la ingesta de ciertos disacáridos prebióticos reduce el pH en el colon y las concentraciones de amonio, p-cresol e indol, y produce un aumento en la población de bifidobacterias y lactobacilos y un descenso en la población de bacteroides. Un valor bajo de pH puede, además, promover la acción de las enzimas glutatión-S-transferasas, de gran importancia en los mecanismos de desintoxicación celular ya que facilitan la eliminación de xenobióticos, carcinógenos y otras sustancias nocivas para las

células. Por otro lado, dado que el crecimiento bacteriano aumenta el peso del bolo fecal, disminuyéndose el tiempo de tránsito intestinal, se reduce el tiempo de exposición de la microflora a carcinógenos potenciales. Además, hay evidencias de que las sales biliares están implicadas en la carcinogénesis colónica y que los oligosacáridos prebióticos reducen su concentración, probablemente a través de la reducción del pH.

-Tratamiento de la encefalopatía hepática. La encefalopatía hepática es un término que se utiliza para describir los efectos nocivos de la insuficiencia hepática sobre el sistema nervioso central. Parece estar provocada por sustancias como el amoníaco y otras neurotoxinas generadas por ciertas bacterias gastrointestinales y puede deberse a una ingesta alta de proteína en la dieta. En el caso de pacientes cirróticos, por ejemplo, la lactulosa (Marteau, 2001; Szilagyi, 2002) y los xilooligosacáridos (Kajihara y col., 1999; Kajihara y col., 2000; Kajihara y col., 2001) han sido extensamente utilizados para controlar los niveles de amoníaco en sangre. El mecanismo que explica este control viene dado por el aumento de bifidobacterias y la no proliferación de bacterias productoras de amoníaco, debido al descenso de pH en el medio. Además, esta acidificación del entorno del colon reduce las posibilidades de formación de amoníaco a partir de compuestos nitrogenados y de otras toxinas cerebrales (Topping, 1996; Weber, 1996).

-Modulación del sistema inmune. Parece ser que existe una cierta relación entre la ingesta de oligosacáridos prebióticos con la modulación del sistema inmune. Aunque el mecanismo por el cual este efecto tiene lugar aún no se ha establecido, existen varias hipótesis al respecto (Schley y Field, 2002). Una de ellas y, quizás la más importante, plantea que las bacterias ácido lácticas o bien la pared celular o los componentes citoplasmáticos de las mismas penetran en las células epiteliales intestinales activando el tejido linfático asociado al mismo (Manning y Gibson, 2004).

Algunos autores consideran que los efectos beneficiosos para la salud causados por los oligosacáridos prebióticos son similares a los producidos por la ingesta de la fibra alimentaria ya que incrementan el bolo fecal, reducen el tiempo de tránsito intestinal, controlan el nivel de glucosa y modulan el metabolismo de triglicéridos (Roberfroid y Slavin, 2000; Santos, 2002). Sin embargo, los oligosacáridos prebióticos presentan muchas más ventajas comparándolos con la fibra: requieren una dosis diaria más baja, no causan diarrea si se consumen las cantidades recomendadas, son ligeramente dulces, su textura y gusto es más agradable, y además, son totalmente solubles en agua, físicamente estables y fáciles de incorporar en alimentos y bebidas (Tomomatsu, 1994).

A pesar de los numerosos efectos beneficiosos de los oligosacáridos prebióticos, también es preciso considerar los efectos perjudiciales, principalmente relacionados con su ingesta excesiva, lo que puede provocar molestias intestinales, diarrea y flatulencia. De esta manera, la ingesta de más de 20 g/día de GOS podría provocar diarrea (Sako y col., 1999). La dosis adecuada para originar el efecto bifidogénico también varía en función del tipo de oligosacárido, pero la mayor parte de estos compuestos parecen incrementar el número de bifidobacterias en el colon con una dosis inferior a 15 g/día (Crittenden y Playne, 1996). Esta dosis es variable también en función del tipo de flora del individuo. Roberfroid (2007) estableció que la dosis diaria de oligosacáridos prebióticos no es determinante en el efecto bifidogénico sino que está directamente relacionada con el número de bifidobacterias/g presentes antes de empezar la suplementación en la dieta. Hay estudios que demuestran que una ingesta de 10 g/día de GOS en individuos de edad media y sanos es suficiente para causar efecto bifidogénico, sin embargo, cuando el número inicial de bifidobacterias es bajo, como en el caso de los ancianos, la ingesta de sólo 2,5 g/día es suficiente para causar un aumento en la población de bifidobacterias (Sako y col., 1999; Gibson, 2004).

Aunque hay algunos estudios al respecto, una cuestión importante, no resuelta todavía, es el tiempo que persiste el efecto bifidogénico cuando se interrumpe una dieta rica en prebióticos (Bouhnik y col., 1997). Algunos estudios llevados a cabo en animales de experimentación indican que el efecto bifidogénico desaparece cuando deja de administrarse el prebiótico (Santos y col., 2006).

Por otro lado, como se ha indicado anteriormente, existe una relación muy estrecha entre la estructura del oligosacárido (monómeros que lo constituyen, enlaces...) y el efecto fisiológico que ejerce en el ser humano. A continuación se muestran las características más importantes de los, hasta ahora reconocidos mayoritariamente, como oligosacáridos prebióticos.

1.2.1.3. Lactulosa

Uno de los carbohidratos más estudiados por sus efectos beneficiosos sobre la flor intestinal es la **LACTULOSA**. La lactulosa es un disacárido sintético constituido por una molécula de galactosa y otra de fructosa unidas por un enlace β (1 \rightarrow 4). No se encuentra libre en la naturaleza y se obtiene, principalmente, por isomerización de la lactosa en medio básico, siendo también posible su obtención mediante síntesis enzimática utilizando lactosa, fructosa y β -galactosidasas de diferentes orígenes. En la Figura I8 se muestra su estructura química y sus posibles formas anoméricas. Es más dulce y más soluble que la lactosa y, a

diferencia de ésta, no es hidrolizada por las enzimas presentes en el tracto gastrointestinal humano aunque sí es metabolizada por bifidobacterias y bacterias lácticas en general (Ferchaud-Roucher, 2005).

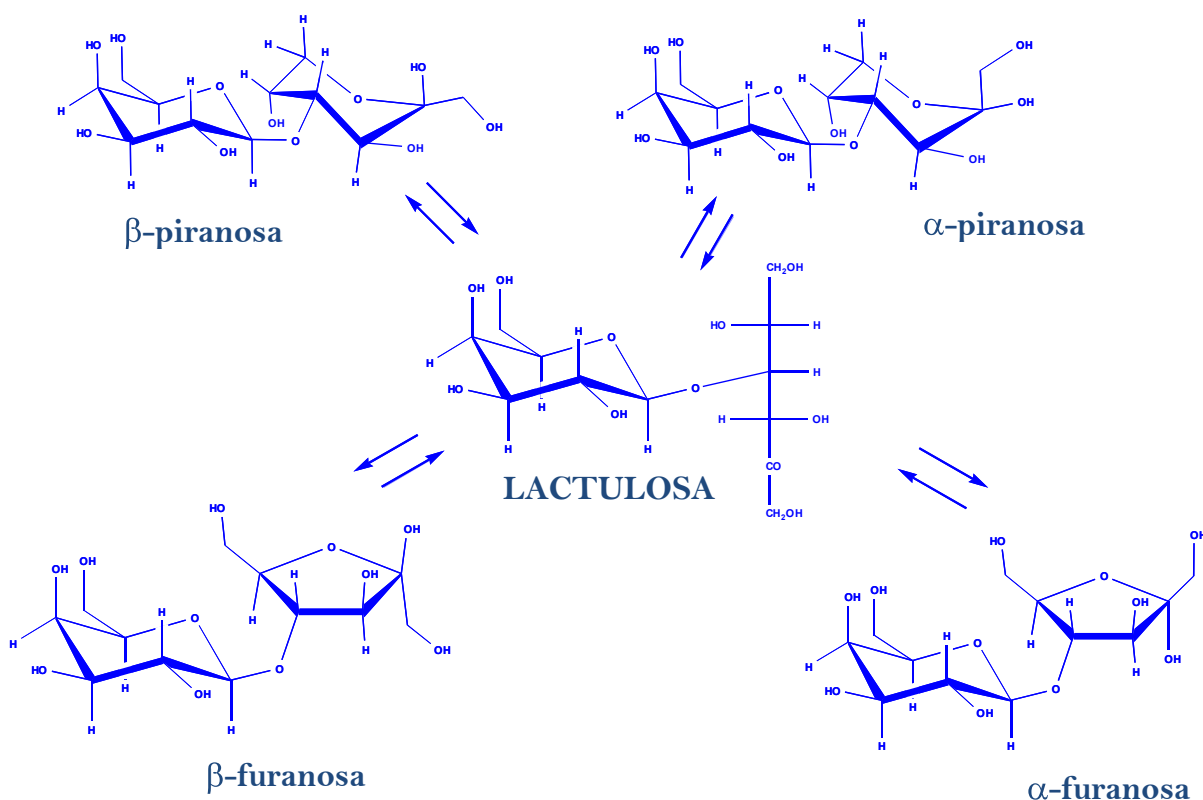


Figura I8.- Estructura química de la lactulosa y sus posibles formas anoméricas.

Los efectos beneficiosos de la lactulosa sobre el intestino grueso se llevan estudiando desde hace más de 50 años. De hecho, la lactulosa se utiliza hoy en día en medicina como tratamiento para la encefalopatía hepática y para el estreñimiento crónico. Además, fue el primer oligosacárido acerca del cual se empezaron a estudiar sus propiedades bifidogénicas a reducidas dosis (Tomoda y col., 1991; Sahota y col., 1992; Terada y col., 1993; Ballonge y col., 1997). Petuely, en 1957, fue el primer investigador que consiguió favorecer el crecimiento de la flora bífidus en niños mediante la adición de lactulosa a la dieta. Posteriormente, Rutloff y col. (1967) publicaron un estudio completo sobre los efectos que ejercía lactulosa sobre la flora fecal debido a su baja absorción en la parte alta del tracto gastrointestinal y su subsecuente asimilación en el intestino grueso. Desde entonces y, hasta el momento actual, un considerable número de estudios han demostrado que el uso de la lactulosa como ingrediente alimentario provoca un aumento de la flora intestinal beneficiosa tras su ingestión (Tuohy y col., 2002),

siendo así el primer oligosacárido en ser comercializado por sus beneficios sobre el tracto gastrointestinal (Aider y Halleux, 2007).

En lo que concierne a las fórmulas infantiles, la adición de un 0,5% de lactulosa a las mismas, se considera una dosis adecuada para conseguir una estimulación de las bifidobacterias hasta el punto de alcanzar poblaciones bacterianas similares en los bebés alimentados con leche materna; la incorporación de un 1% ejercería, sin embargo, un efecto laxante (Nagendra y col., 1995). Los estudios de almacenamiento llevados a cabo con el fin de conocer la estabilidad de estas fórmulas infantiles con lactulosa adicionada, han indicado que su adición no altera ni la aceptabilidad ni la estabilidad del producto, conservando todas sus características hasta 16 semanas de almacenamiento a 38°C. Además, estudios llevados a cabo en adultos sanos han demostrado que la ingesta de 10 g por día de lactulosa provoca un incremento significativo de la población de bifidobacterias, determinándose simultáneamente una disminución en la población de clostridias (Tuohy y col., 2002). El gran número de estudios realizados en humanos (Bouhnik, y col. 2004; Rumi y col., 2004; Becker y col., 2006, Bratten, 2006; Vanhoutte y col., 2006; Voght y col., 2006) ha permitido que, en la actualidad, la lactulosa sea reconocida como prebiótico. Pese a todas estas ventajas, el principal problema de la lactulosa es la producción de gases durante su fermentación debido a que es consumido por las bacterias en las zonas más proximales del colon (Tuohy y col., 2002).

La lactulosa, al igual que otros prebióticos reconocidos, también estimula la absorción de Ca y Mg. Ensayos clínicos llevados a cabo con 24 hombres voluntarios adultos mostraron que con la ingesta de alimentos con un contenido de 4 g de lactulosa, 300 mg de Ca y 150 mg de Mg, la absorción de estos minerales aumentó sin causar efectos secundarios (Seki y col., 2007). Otros estudios llevados a cabo con mujeres postmenopáusicas también demostraron que la ingesta diaria de lactulosa a lo largo de 9 días incrementó la absorción de calcio (van den Heuvel y col., 1999).

Cuando la lactulosa se utiliza en la manufactura del yogur, pueden mejorarse muchas de las propiedades del mismo. Así, el yogur, parece tener en este caso las mismas propiedades que un laxante suave, mejorando el tránsito gastrointestinal y aumentando la producción fecal en voluntarios sanos (Porkka y col., 1988). Además, su eficacia en el tratamiento del estreñimiento infantil es comparable al de un yogur conteniendo una mezcla de fibra dietética (Kokke y col., 2008). La adición de lactulosa reduce el periodo de incubación en la producción de bio-yogur conteniendo *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* y provoca un incremento de células pertenecientes a *B. bifidum* durante el almacenamiento, lo que indica que la suplementación con lactulosa puede ser una buena alternativa

para mantener el número de bacterias probióticas en el yogur por encima de la dosis sugerida como la cantidad mínima terapéutica ($\sim 10^7$ ufc/g) durante el almacenamiento (Özer y col., 2005).

Recientemente, Pham y Shah (2008) han observado que la adición de un 0,5 % (p/p) de lactulosa a leche de soja parece favorecer el crecimiento de *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium animalis*, que son capaces de transformar los glicósidos de isoflavonas que son fitoquímicamente inactivos a aglicones de isoflavonas cuya actividad estrogénica está ya reconocida. Además, estos autores demostraron que la suplementación de la leche de soja con lactulosa dio lugar a un incremento en la concentración de aglicones durante la fermentación de la misma con lactobacilos (Pham y Shah, 2008b).

1.2.1.4. Fructooligosacáridos (FOS)

Los FOS son oligosacáridos cuya fórmula general es GF_n (una molécula de glucosa terminal y n unidades de fructosa unidas por enlaces $\beta(2 \rightarrow 1)$ o FF_n (n moléculas de fructosa unidas por enlaces $\beta(2 \rightarrow 1)$) (Figura I9). La longitud de la cadena es variable y el número de moléculas de fructosa puede variar de 2 a más de 70 unidades. Según el grado de polimerización (DP) se pueden considerar oligofructosa, $DP < 9$ (valor medio $DP = 4,8$) ó inulina con un DP de hasta 60 unidades (valor medio $DP = 12$).

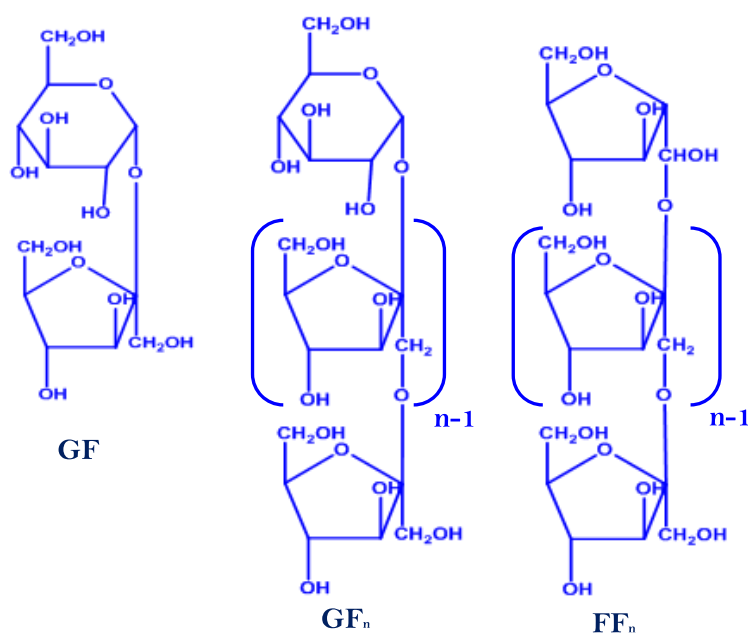


Figura I9.- Estructuras químicas de la sacarosa (GF) y fructooligosacáridos (GF_n y FF_n) (Gibson and Roberfroid, 1995).

Este tipo de oligosacáridos se pueden obtener mediante producción *in vitro*, por transfructosilación enzimática a partir de la sacarosa, por hidrólisis de la inulina (Hidaka y col., 1988; Molis y col., 1996) o, de manera natural, por fructosiltransferasas presentes en algunos vegetales como los espárragos, el puerro, la achicoria, la cebolla, el plátano o el ajo. Debido a que los FOS se encuentran en muchos de los alimentos de consumo habitual en la dieta de cualquier adulto, se clasifican legalmente como ingredientes alimentarios naturales y no como aditivos por las autoridades de la Comunidad Europea, siendo, además reconocidos como GRAS (Generally Recognised As Safe) en USA y como FOSHU (Foods of Specific Health Use) en Japón.

El tipo de enlace β (2 \rightarrow 1) que presentan los FOS, concretamente la configuración β del carbono anomérico, hace a estos compuestos resistentes a la hidrólisis por las enzimas digestivas humanas. En estudios de fermentación llevados a cabo con cultivos puros, la mayor parte de las bifidobacterias utilizaron los FOS como sustrato, además, muchos otros tipos de bacterias también fueron capaces de metabolizarlos. Los sistemas de fermentación *in vitro* con muestras fecales, tanto en continuo como en discontinuo demostraron, también, la selectividad de las bacterias hacia este tipo de sustratos, observándose un gran aumento en la población de las bifidobacterias y lactobacilos (aunque en menor grado) con respecto al resto de poblaciones. Los ensayos llevados a cabo con animales también demostraron el carácter prebiótico de los FOS (MacFarlane y col., 2008).

En humanos, son varios los estudios realizados, aunque en general el mayor efecto bifidogénico tuvo lugar en aquellos sujetos con un menor recuento inicial de bifidobacterias (10^7 /g heces). Además, tras la ingesta de FOS se observó una disminución de bacteroides y clostridias, manteniéndose durante el período de tratamiento. El incremento de la población de bifidobacterias persistió después de la supresión de la dieta rica en prebióticos. Este tipo de estudios se llevaron a cabo de manera similar en Europa, Japón y Norte América, y aunque se encontraron grandes variaciones con respecto a la composición bacteriana de los sujetos sometidos a estudio, en todos los casos se obtuvieron resultados positivos y los FOS se comportaron como prebióticos.

Estos estudios y su reconocimiento como GRAS han permitido que hoy en día la inulina y la oligofructosa se utilicen sin restricciones en múltiples alimentos como yogures, bebidas, galletas, cereales y productos de bollería, etc. o formando parte de alimentos simbióticos. Algunos de estos alimentos, presentes actualmente en el mercado, son las barritas de cereales, los yogures y las bebidas con FOS, los yogures simbióticos, etc.

1.2.1.5. Galactooligosacáridos (GOS)

Los GOS son oligosacáridos que contienen de 2 a 9 moléculas de galactosa unidas a una de glucosa terminal mediante un enlace $\beta(1\rightarrow4)$ (Figura I10). Este tipo de oligosacáridos se obtienen por transgalactosilación a partir de la lactosa, aunque también se encuentran presentes de forma natural en la leche humana y animal. Diversas investigaciones sugieren que los oligosacáridos presentes en la leche humana resisten la digestión siendo parcialmente absorbidos pasando al torrente sanguíneo donde permanecen a concentraciones elevadas para ejercer efectos sistémicos (Engfer y col., 2000; Gnoth y col., 2000). Puesto que los oligosacáridos presentes en la leche humana son derivados de la lactosa, se ha atribuido la presencia de flora bífidus en los lactantes, a los oligosacáridos que contienen galactosa (Matsumoto y col, 1993).

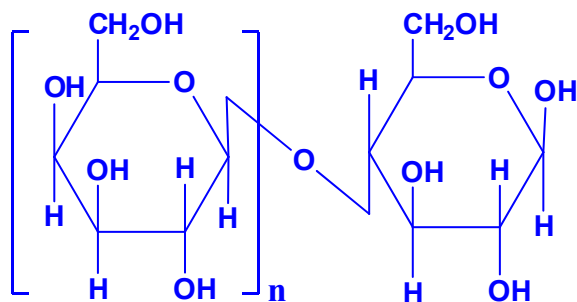


Figura I10.- Estructura química de los galactooligosacáridos.

Los GOS, al igual que los FOS son reconocidos legalmente en todos los países de la Unión Europea como ingredientes alimentarios y no como aditivos debido a su presencia de forma natural en la leche materna, siendo además reconocidos también como GRAS en USA y como FOSHU en Japón (Tzortis y Vulevic, 2009). Su incorporación en fórmulas maternizadas (junto con FOS), de larga tradición en Japón, y mucho más reciente en Europa, ha permitido imitar los efectos de la leche humana en la flora de los lactantes.

Varios estudios han demostrado la adecuación de los GOS para inducir el crecimiento de bifidobacterias, tanto en estudios *in vitro* con monocultivos (Tanaka y col., 1983) como en estudios *in vivo* con ratas (Rowland y Tanaka, 1993; Andrieux y Szylit, 1992) y con humanos (Ito y col., 1993; Bouhnik y col., 1997 y Boehm y col., 2005).

1.2.1.5.1. Transgalactosilación

Los GOS pueden ser obtenidos por reacciones de transgalactosilación catalizadas por β -galactosidasas (EC 3.2.1.23) procedentes de diversos orígenes (levaduras, hongos y bacterias) durante la hidrólisis de la lactosa. Aunque a lo largo de los años han sido varios los mecanismos propuestos para la acción de esta enzima (Wallenfels y Weil, 1972, Prenosil y col., 1987) se ha demostrado que muchas β -galactosidasas de diferentes orígenes microbianos poseen dos residuos de ácido glutámico, Glu⁴⁸² y Glu⁵⁵¹, que actúan, respectivamente, como donador de protones y como nucleófilo, de manera simultánea en la reacción enzimática. El mecanismo de reacción se muestra en la Figura I11.

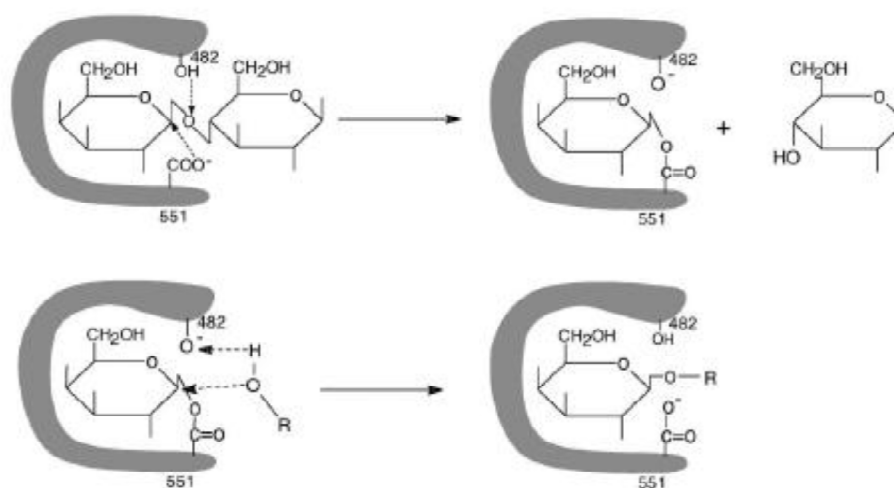


Figura I11.- Mecanismo de acción de la enzima β -galactosidasa en la obtención de GOS a partir de lactosa (Zhou y Chen, 2001).

En el primer paso tiene lugar la formación del complejo enzima-galactosa y la liberación simultánea de la glucosa. Posteriormente, la enzima transfiere la galactosa a aceptores nucleofílicos que contienen un grupo hidroxilo. La transferencia al agua produce galactosa y la transferencia a un azúcar, origina di-, tri- y oligosacáridos de mayor peso molecular. Estos oligosacáridos formados, se convierten, a su vez, en substratos para la enzima y son lentamente hidrolizados. A mayor concentración de carbohidrato, mayor formación de oligosacáridos y a menor concentración, mayor porcentaje de hidrólisis. A los GOS así obtenidos se les conoce también, para diferenciarlos de los naturales, con el nombre de transgalactooligosacáridos (TOS).

En estos procesos de transgalactosilación, utilizando enzimas en discontinuo o en continuo y soluciones concentradas de lactosa (normalmente obtenida de

suero de leche de vaca) se originan mezclas complejas de GOS con enlaces β (1 \rightarrow 6), β (1 \rightarrow 3) y β (1 \rightarrow 4) (Matsumoto y col. 1993) y un grado de polimerización de entre 2 y 6, dependiendo de la fuente de la enzima y de las condiciones de reacción empleadas, obteniéndose. En la Figura I12 se muestra un esquema de la producción industrial de GOS. En estas mezclas, los trisacáridos son los principales productos de reacción siendo, la 4'-galactosil-lactosa o la 6'-galactosil-lactosa los compuestos mayoritarios en función de la enzima empleado (Sako y col., 1999, Del Val y col, 2001). Además, también pueden obtenerse cantidades importantes de disacáridos, siendo la alolactosa (6-O- β -D-galactopiranosil-D-glucosa) el que se forma en mayores concentraciones (Mahoney, 1998; Chen y col., 2003).

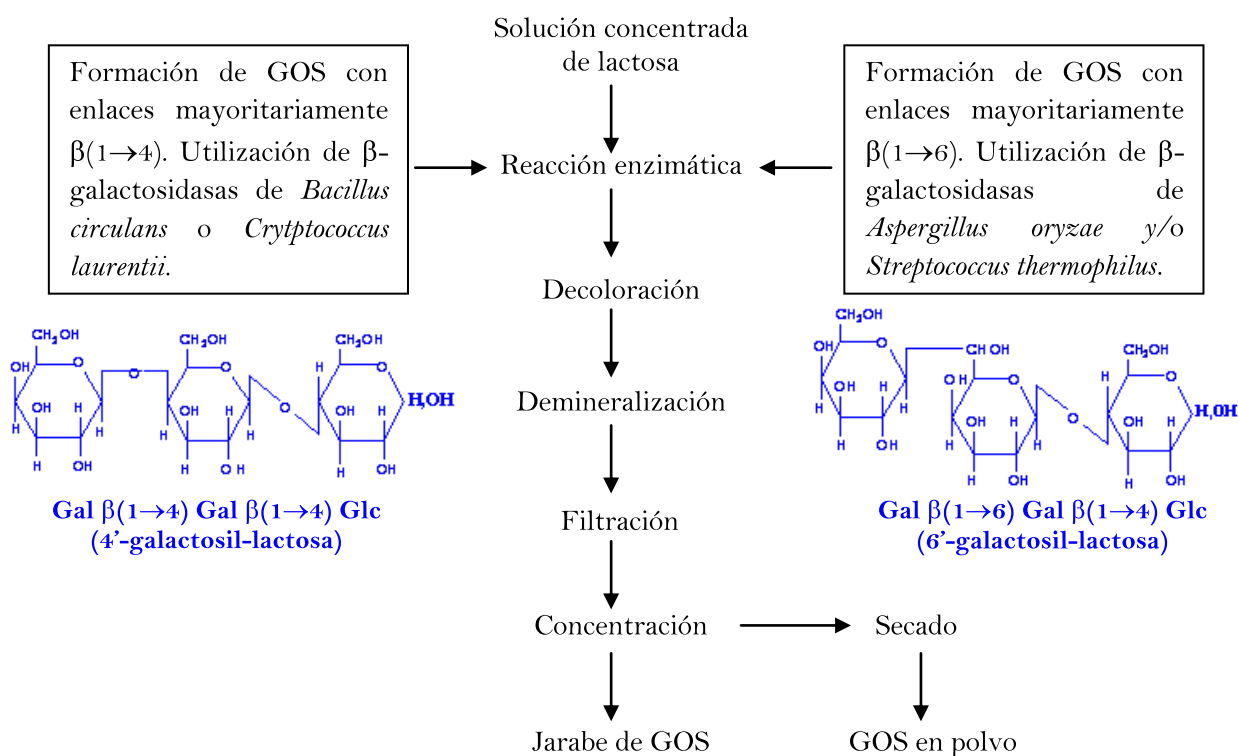


Figura I12.- Producción industrial de GOS (Matsumoto y col., 1993).

1.2.1.5.2. Cinética de las reacciones de hidrólisis y transgalactosilación

Dada la complejidad del mecanismo de hidrólisis y transgalactosilación, muchos autores han desarrollado modelos cinéticos que permiten explicar la formación de los GOS. Así, Boon y col., (1999) propusieron dos modelos cinéticos

para describir la síntesis de oligosacáridos y la hidrólisis de lactosa utilizando una β -galactosidasa de *Bacillus circulans*. En ambos modelos (Figura I13) se simplificó la síntesis de oligosacáridos considerando que únicamente se formaban trisacáridos.

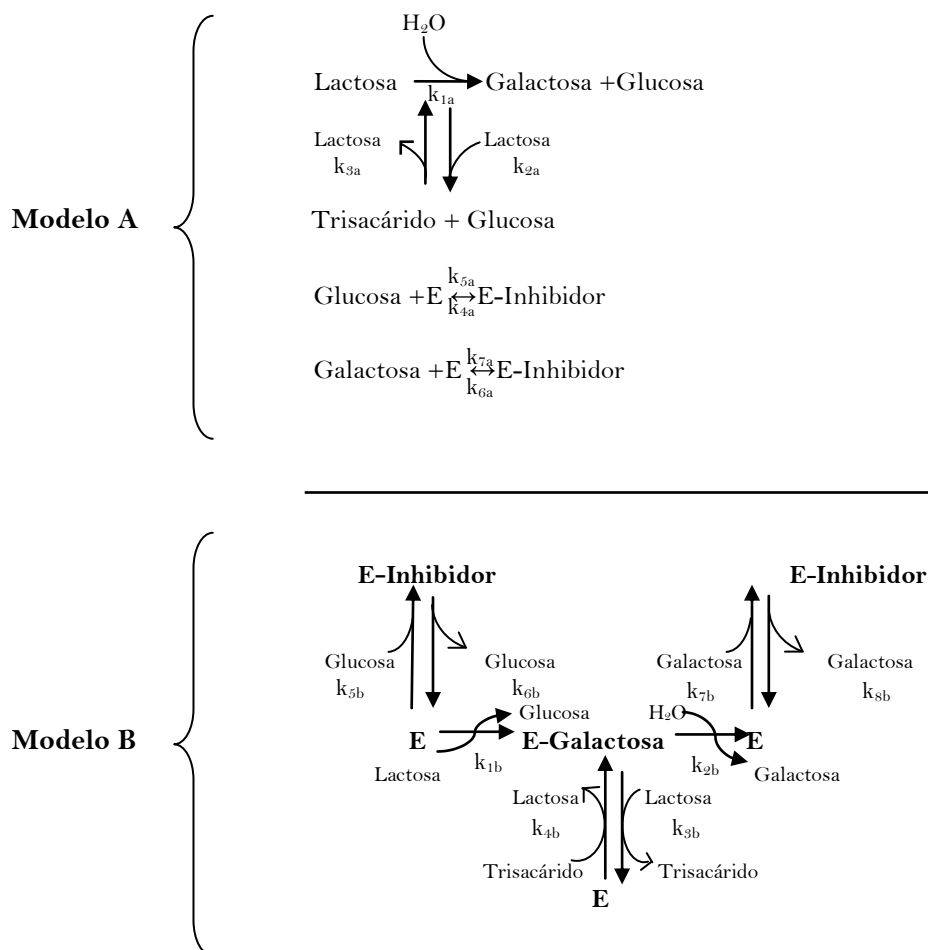


Figura I13.- Modelos cinéticos propuestos por Boon y col. (1999) para describir la síntesis de oligosacáridos y la hidrólisis de lactosa utilizando una β -galactosidasa de *Bacillus circulans*.

En el modelo A, la hidrólisis de lactosa y la síntesis de trisacáridos son consideradas dos reacciones paralelas de segundo orden donde únicamente la síntesis de trisacáridos es reversible. La inhibición de glucosa y galactosa también se tiene en cuenta.

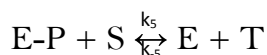
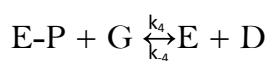
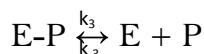
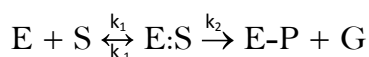
En el modelo B, tanto la lactosa como el agua pueden atacar el complejo galactosil-enzima. Se asume que la síntesis de trisacáridos es reversible y se incluye la inhibición por parte de glucosa y galactosa.

Otros factores como la mutarrotación de la galactosa (Bakken y col. 1992), la producción de alolactosa (Huber y col., 1976) y la formación de tri- y tetrasacáridos de manera independiente (Iwasaki y col., 1996) no se consideran para evitar así la utilización de un mayor número de parámetros e incrementar la complejidad de los modelos propuestos (McMeekin y col., 1993).

La estimación de los parámetros de los modelos A y B se realizó a partir de datos experimentales. Los modelos se evaluaron posteriormente, por separado y las deficiencias se examinaron mediante la representación de los parámetros frente a la concentración de lactosa. El modelo para el cual los parámetros fueron independientes de la concentración inicial de lactosa (modelo B) se consideró el mejor para describir la síntesis a varias concentraciones de lactosa.

Posteriormente Boon y col., (2000) evaluaron la influencia de la temperatura y el origen de la enzima en la síntesis enzimática de oligosacáridos basándose en el modelo anterior. Los parámetros cinéticos se determinaron usando datos obtenidos experimentalmente a varias temperaturas y utilizando β -galactosidasas de *B. circulans*, *A. oryzae*, *K. lactis* y *Kluyveromyces fragilis*. El efecto de la temperatura en los parámetros cinéticos se describió con la ecuación de Arrhenius, excepto para la inhibición. Las diferencias entre β -galactosidasas fueron evidentes, variando el tipo, la concentración y el tamaño de los oligosacáridos producidos.

Por otro lado, Kim y col. (2004) desarrollaron un modelo para la síntesis de oligosacáridos utilizando una β -galactosidasa de *K. lactis*. En este nuevo modelo propuesto, la lactosa actúa como sustrato y como aceptor, pero a elevadas concentraciones, tiene más posibilidades de actuar como aceptor para formar trisacáridos. La galactosa se enlaza a la enzima libre formando el complejo enzima-galactosa que reacciona mediante transgalactosilación con glucosa o lactosa como aceptores. La glucosa actúa como un buen aceptor, reaccionando sólo con el complejo enzima-galactosa y formar así, disacáridos galactosa-glucosa. Se asume la existencia de sólo una etapa limitante (formación del complejo enzima-galactosa) en el mecanismo de reacción y que los otros pasos son reversibles. Así, se propusieron las siguientes ecuaciones:



Donde:

E= enzima

S (sustrato)=lactosa

P (producto)= galactosa

G=glucosa

E:S= complejo no covalente enzima-lactosa

E-P= complejo covalente galactosil-enzima

D= disacáridos galactosa-glucosa

T= trisacáridos

Todos los modelos desarrollados se corresponden con modelos cinéticos que responden a β -galactosidasas concretas y a unas condiciones de reacción adecuadas a las mismas. Por ello y, puesto que la fuente de la enzima y las condiciones de reacción regulan la cantidad y el tipo de oligosacáridos producidos, los modelos desarrollados no pueden explicar de manera general la producción de oligosacáridos para todos los tipos de enzimas y condiciones de reacción.

1.2.1.5.3. Preparados enzimáticos comerciales

Las β -galactosidasas se pueden obtener a partir de una gran variedad de fuentes como pueden ser microorganismos, plantas y animales, definiendo notablemente sus propiedades en función de su origen (Mahoney, 1998). Entre las diferentes fuentes existentes, los microorganismos, ofrecen un mayor número de ventajas tales como su fácil manipulación, gran velocidad de multiplicación y gran rendimiento en la producción. En el mercado existen varios preparados enzimáticos con actividad β -galactosidasa, tal y como se muestra en la Tabla I4, siendo los más extensamente utilizados los derivados de *Kluyveromyces sp.* y *Aspergillus sp.*

Maxilact (DMS Food Specialities) y Lactozym (Novozymes), son extractos puros de β -galactosidasas procedentes de *K. lactis*, extensamente utilizados en la industria láctea para hidrolizar la lactosa obteniendo alimentos con bajo contenido en dicho carbohidrato, y por tanto, aptos para personas intolerantes. Existen otros preparados comerciales que, si bien, no presentan mayoritariamente actividad β -galactosidasa son también importantes. Tal es el caso de Pectinex Ultra SP-L (Novozymes) obtenido a partir de *Aspergillus acuelatus* y que se emplea en la clarificación de zumos debido a su actividad pectinolítica. Esta preparación presenta como actividad secundaria la β -galactosidasa, entre otras, y ha sido objeto de estudio en algunos trabajos sobre transgalactosilación de lactosa (Del Val y col., 2001; 2003).

Tabla I4.- Algunas de las preparaciones enzimáticas de β -galactosidasas disponibles comercialmente (Panesar y col., 2006).

Origen	Nombre comercial	Proveedor
Bacterias		
<i>Bacillus sp.</i>	Novozym 231	Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark
<i>Escherichia coli.</i>	β -galactosidase	Sigma-Aldrich, UK
Levaduras		
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Lactase	DSM Food Specialities, Delft, The Netherlands
	β -galactosidase	SNAM Progetti, Italy
<i>Saccharomyces fragilis</i>	β -galactosidase	Sigma-Aldrich, UK
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Lactozyme	Sigma-Aldrich, UK
<i>Kluyveromyces sp.</i>	Lactase NL	Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark
<i>Candida pseudotropicalis</i>	Neutral Maxilact	Enzyme Development Corporation, NY, USA
	Lactase	Pfizer, Milwaukee, USA
Hongos		
<i>Aspergillus niger</i>	Sumylact	Sumitomo Chemical, Japan
	Lactase	Valio Laboratory, Finland
<i>Aspergillus oryzae</i>	Fungal lactase	Enzyme Development corporation, NY, USA
	Biolactase	Biocon (US) Inc., Lexington, USA
	Lactase 2214C	Rohm, Darmstadt, Germany
	β -galactosidase	Sigma-Aldrich, UK

1.2.1.5.4. Galactooligosacáridos comerciales

Desde al menos 30 años, los GOS se han utilizado principalmente en Japón y en menor medida en Europa como ingredientes alimentarios y, en la actualidad, sus aplicaciones se están extendiendo rápidamente. Hoy en día las compañías japonesas continúan dominando el mercado los productos con GOS así como la actividad I+D relacionada con los mismos. Europa ha aumentado su interés hacia este tipo de productos y varias compañías ya se dedican a su producción. Por el contrario el mercado en USA es prácticamente inexistente. Las principales compañías dedicadas a esta actividad son Yakult Honsa (Tokyo, Japan), Nissin Sugar Manufacturing Company (Tokyo, Japan), Snow Brand Milk Products (Tokyo, Japan), Friesland Foods Domo (ex Borculo Domo ingredients) in the Netherlands and Clasado Ltd (UK). En la Tabla I5 se muestran las principales preparaciones comerciales de GOS existentes en el mercado actual producidas por estas compañías.

Tabla I5. – Galactooligosacáridos comerciales (modificado de Gibson y col., 2000).

Producto	Presentación	Contenido en oligosacáridos (p/p)	Fabricante
VivinalGOS	Jarabe (75% de carbohidratos) Polvo	57% (jarabe) 29% (polvo)	Friesland Food Domo, Neteherlands
Bimuno	Polvo y Jarabe	52% (polvo)	Clasado Ltd.
Oligomate 55	Jarabe (75% de carbohidratos)	>55%	Yakult Honsha Co. Ltd, Japan
Oligomate 55P	Polvo	>55%	Yakult Honsha Co. Ltd, Japan
TOS-100	Polvo	>99%	Yakult Honsha Co. Ltd, Japan
Cup-Oligo H-70	Jarabe (75% de carbohidratos)	70%	Nissin Sugar Manufacturing Co. Ltd, Japan
Cup-Oligo P	Polvo	70%	Nissin Sugar Manufacturing Co. Ltd, Japan

La mayor parte de las industrias producen diferentes clases de productos en función de su pureza y forma (jarabe y/o sólido). Los productos suelen ser mezclas de tri-, tetra-, penta-, y hexa-galactooligosacáridos y suelen emplearse β -galactosidasas de diferentes tipos de microorganismos (Tanaka y col. 1983). Así, por ejemplo, el Bimuno, se produce utilizando la actividad del microorganismo *Bifidobacterium bifidum* y contiene principalmente GOS con enlace $\beta(1\rightarrow3)$ mientras que Cup-Oligo y VivinalGOS presentan también enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ principalmente, estando el primero producido por enzimas de *Cryptococcus laurentii* y el segundo por enzimas de *B. circulans*. El Oligomate, una de las mezclas de GOS más ampliamente utilizada en la actualidad, se obtiene sin embargo combinando la actividad β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* y *Streptococcus thermophilus* (Ito y col., 1990). En este caso, los GOS obtenidos son principalmente compuestos con mezclas de enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ y $\beta(1\rightarrow6)$. Su composición final consta de un 36% de tri-, tetra-, penta-, y hexagalactooligosacáridos, un 16% de disacáridos galactosa-glucosa y galactosa-galactosa; 38% de monosacáridos y un 10% de lactosa.

Como es obvio, en estas preparaciones, el principal inconveniente es el elevado contenido en monosacáridos y lactosa que puede enmascarar el efecto bifidogénico del resto de los GOS presentes en la mezcla. Por ello, resulta de gran interés el profundizar en los procedimientos de obtención y purificación de las

mezclas de GOS con el objeto de obtener fracciones más enriquecidas en los GOS de mayor interés bifidogénico. Además, otra de las tendencias en investigación sobre prebióticos, es la búsqueda de nuevos oligosacáridos con propiedades bifidogénicas mejoradas respecto a los oligosacáridos ya descritos, que permitan llegar a las porciones más distales del intestino grueso donde puedan ser fermentados sin apenas efectos secundarios para el consumidor. Por lo tanto, es preciso disponer no sólo de técnicas analíticas avanzadas para la determinación y la caracterización de nuevas especies moleculares que pudieran ser sintetizadas sino también de los métodos de fermentación *in vitro* e *in vivo* adecuados para posteriormente poder determinar su carácter prebiótico.

1.3. MÉTODOS *IN VITRO* E *IN VIVO* PARA LA DETERMINACIÓN DEL CARÁCTER PREBIÓTICO

Entre los tres criterios, mencionados con anterioridad, que debe cumplir un ingrediente para ser considerado prebiótico, el tercero, que concierne a la estimulación selectiva de las bacterias beneficiosas es el más difícil de demostrar y de cumplir. Es más, requiere un exhaustivo muestreo en condiciones anaeróbicas seguido de un análisis microbiológico fiable que permita cuantificar diferentes géneros bacterianos. Por ello, y a medida que el campo de los prebióticos se ha ido desarrollando, la metodología para determinar su funcionalidad, especialmente relacionada con los cambios en la flora gastrointestinal, también se ha ido modificando y perfeccionando. A continuación se muestran los estudios más relevantes realizados en diferentes tipos de cultivos, incluyendo fecales además de ensayos *in vivo*.

Cultivos puros

La vía más sencilla, y la primera en ser utilizada en los estudios con prebióticos, suele ser la que se lleva a cabo con cultivos puros. El sustrato se añade a un medio basal donde tiene lugar el crecimiento bacteriano durante un tiempo de incubación determinado (Gibson y Wang, 1994). La forma más habitual de monitorizar el crecimiento bacteriano es mediante la medida de la densidad óptica (DO) de los cultivos o bien por recuento de las colonias en placa.

Este tipo de estudio nos da una idea de cómo tiene lugar la fermentación del sustrato a evaluar, pero no tiene en cuenta la posible interacción entre bacterias. Como es sabido, el tracto gastrointestinal humano posee más de 500 especies bacterianas descritas en la bibliografía, estimándose que este número podría incrementarse, en la realidad, hasta 1000 especies diferentes. De ahí, la importancia de considerar las interacciones existentes entre las diferentes

especies, a la hora de evaluar el efecto de un determinado sustrato sobre su crecimiento.

Cultivos mixtos

Dentro de los estudios llevados a cabo con cultivos mixtos, el más sencillo es aquel que conlleva la utilización de un número determinado de especies seleccionadas (beneficiosas y perjudiciales) del tracto gastrointestinal. De esta manera se introduce en el sistema un cierto grado de competición entre los microorganismos, aunque sin reflejar del todo las interacciones que ocurren realmente en la microbiota intestinal en las condiciones fisiológicas. Pese a esto, este modelo de fermentación es muy útil para predecir cómo influye el sustrato a estudio en las especies consideradas patógenas.

Un método mucho más fiable es el uso de inóculos fecales, que asegura que un representativo número de especies bacterianas se exponga al carbohidrato a ensayar (Wang y Gibson, 1993). El problema que presentan estos sistemas en discontinuo, es que la cantidad de sustrato está limitada y sólo es útil para experimentos con un tiempo de duración pequeño. El estudio de las curvas de crecimiento en este tipo de experimentos indica que al disminuir la concentración de sustrato con el tiempo, el crecimiento bacteriano llega un punto en el que disminuye o bien alcanza un estado estacionario. Por el contrario, hay que tener en cuenta que en el ser humano, el colon se está llenando constantemente de nutrientes. Así, una aproximación mucho más realista es el de las fermentaciones en continuo, experimentos donde se puede introducir nutrientes de manera constante (Gibson y Wang, 1994b). Este mecanismo permite determinar de manera muy aproximada, el metabolismo del carbohidrato considerado como posible prebiótico.

En este tipo de ensayos en discontinuo y en continuo, se suelen simular las condiciones de la zona más distal del colon, pero como se sabe, la composición de la flora gastrointestinal es diferente en las distintas regiones del intestino. Por ello, ha sido preciso desarrollar modelos en continuo que simulan todas las regiones de nuestro tracto gastrointestinal.

Modelos in vitro del tracto gastrointestinal

El intestino humano, tal y como se ha indicado con anterioridad, es un ecosistema microbiano heterogéneo. La principal fuente de nutrientes es la dieta y casi de manera constante, los residuos de los productos alimenticios atraviesan la válvula ileocecal entrando en el colon, actuando como sustratos para las bacterias. Además, las diferentes regiones del colon presentan condiciones fisiológicas

diferentes. En la región proximal, el suministro de sustrato es muy rápido y, por lo tanto, el crecimiento bacteriano también lo es y el pH es ácido (debido a la formación de productos finales ácidos tales como los SCFAs). En la zona distal, por el contrario, las bacterias crecen más lentamente, el suministro de nutrientes disminuye y su entorno posee un pH menos ácido cercano a la neutralidad.

Un buen modelo gastrointestinal debería ser capaz de reflejar estas diferencias mediante el ajuste de todos los parámetros físico-químicos posibles. Uno de los modelos existentes en investigación es el quimiostato de tres fases (Figura I14), basado en la simulación de las diferentes áreas del intestino grueso, la proximal, la transversal y la distal. Este sistema ha sido validado mediante la comparación con muestras tomadas en autopsias, llegando a la conclusión de que refleja muy bien la realidad de los procesos fermentativos que se tienen lugar en cada zona. Los estudios llevados a cabo sobre el desarrollo de la flora microbiana en las tres partes que simulan las del intestino permiten predecir de manera fiable lo que ocurre *in vivo*. También se han empleado fermentadores en continuo para simular el tracto intestinal desde el yeyuno al colon descendente (Molly y col., 1993).

Ambos modelos, en tres y cinco etapas, se han empleado de manera muy eficaz en la investigación sobre prebióticos, pero los avances que tendrán lugar en un futuro no muy lejano, dentro de la ingeniería química, permitirán la utilización de tejidos celulares y sistemas de diálisis que ayudarán a mejorar los modelos actuales.

Ensayos llevados a cabo en animales

Los animales empleados rutinariamente para determinar la naturaleza prebiótica de un sustrato son, normalmente, ratas y ratones (Rowland y Tanaka, 1983). Las ratas convencionales, gnobióticas (libres de gérmenes) o aquellas inoculadas con un único tipo o un número limitado de microorganismos, aunque son utilizadas para estudiar el carácter prebiótico de un sustrato, no reflejan la situación real del tracto gastrointestinal. Las ratas inoculadas con flora fecal humana, conocidas como ratas HFA son un modelo mucho más próximo a la realidad, ya que representan la situación en el intestino humano, pero la fisiología del intestino sigue sin ser la misma. El mayor inconveniente con los experimentos llevados a cabo en animales de laboratorio es, además de las diferencias anatómicas, la coprofagia que practican. Un modelo mucho más cercano al del tracto gastrointestinal humano podrías ser el uso de primates, sin embargo, los problemas logísticos y económicos hacen que este modelo sea muy difícil de llevar a cabo. Por ello, en los últimos años se han empleado animales de compañía y de

granja, siendo el cerdo el animal preferido para este tipo de estudios debido a sus similitudes con el ser humano.

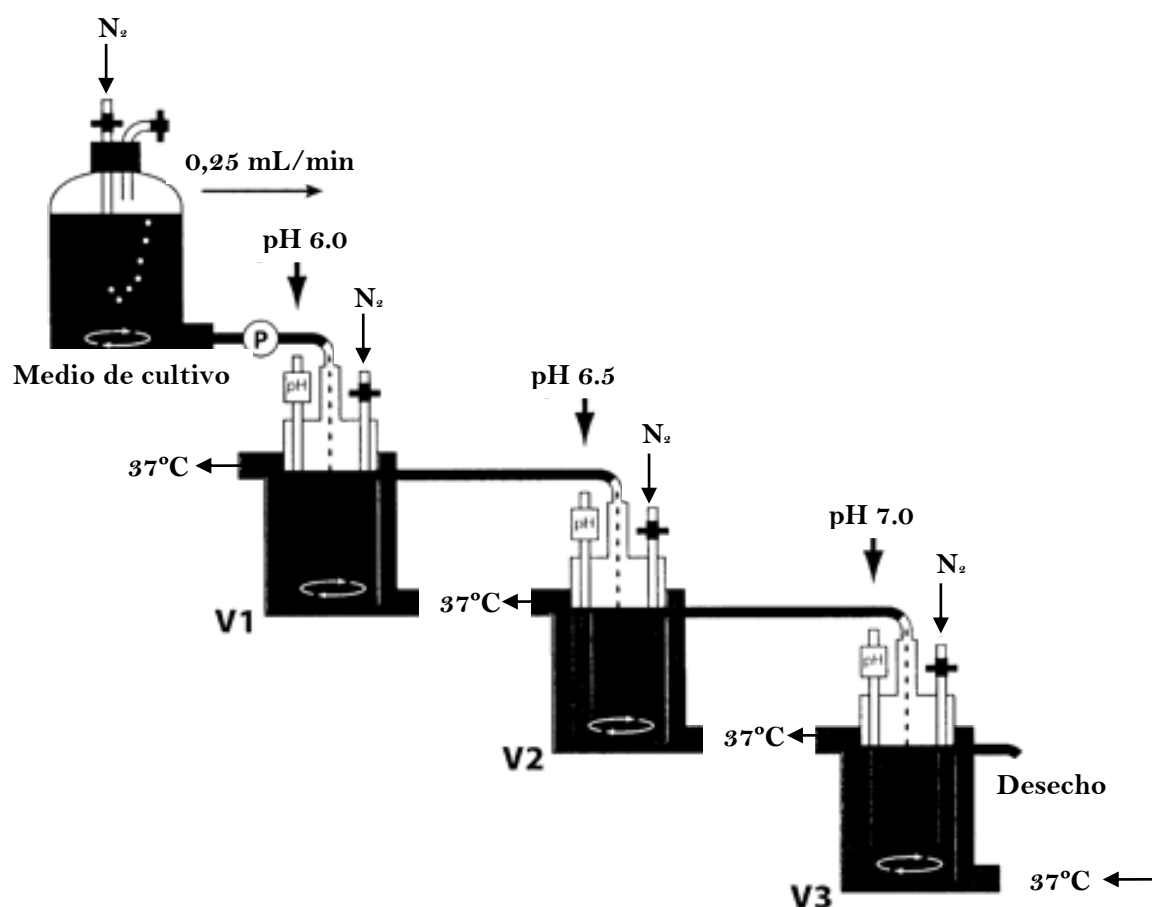


Figura I14.- Esquema del sistema de cultivo en tres etapas utilizado para simular las condiciones del colon humano. V1 simula las condiciones de la zona próxima y V3 de las zonas distales. V1 se inocula con heces en condiciones anaerobias a 37°C. El sistema opera en cascada y V1 alimenta a V2 que posteriormente, alimenta a V3. Después de un período de equilibrio el modelo puede ser inoculado con probióticos o prebióticos (Gibson y Fuller, 2000)

Ensayos llevados a cabo en humanos

El seguimiento definitivo de un sustrato para determinar su carácter prebiótico tiene lugar en ensayos llevados a cabo en humanos. En estos ensayos, el sustrato se suministra a voluntarios y se evalúan los cambios microbiológicos en las heces (Gibson y col., 1995). Como las heces son la única zona fácilmente accesible del contenido intestinal, es difícil predecir las reacciones de fermentación que tienen lugar exactamente en el contenido intestinal de la zona proximal del colon. Sin embargo, si un prebiótico potencial puede provocar cambios en la microbiota fecal, entonces puede asumirse que los entornos más sacarolíticos (por ejemplo, el área proximal del colon) también han sido afectados. El mayor

inconveniente que se produce en el seguimiento microbiano en heces es que los métodos microbiológicos convencionales precisan que las muestras sean procesadas rápidamente tras su obtención. Esto se debe a que las bacterias del tracto gastrointestinal reaccionan de manera diferente al almacenamiento, afectando gravemente a los rasgos fenotípicos. En este caso, únicamente las técnicas de Biología Molecular son las herramientas que proporcionan una fiabilidad absoluta a la hora de la caracterización.

1.4. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR PARA LA DETERMINACIÓN DE POBLACIONES BACTERIANAS

Dado que la estructura molecular podría encontrarse ligada a una función concreta, particularmente en el caso de los oligosacáridos a su carácter prebiótico, es también necesario disponer de métodos adecuados para medir el crecimiento de las poblaciones tanto beneficiosas como perjudiciales.

El estudio del potencial prebiótico de los oligosacáridos se ha llevado a cabo durante muchos años mediante técnicas tradicionales de recuento en cultivos. Sin embargo, hoy en día, es sabido que muchos de los microorganismos implicados no pueden ser detectados por estos medios. Además, aunque el crecimiento de estas bacterias nos da una idea de su abundancia relativa, hay que tener en cuenta que no todas las bacterias son cultivables, lo cual supone una limitación de los métodos de medida tradicionales. Por ello, para llevar a cabo la identificación de las diferentes poblaciones bacterianas que forman parte del tracto gastrointestinal han tenido que desarrollarse métodos basados en Biología Molecular que proporcionasen una mayor información y fiabilidad. En la Tabla I6, se indican algunas de las técnicas que pueden utilizarse para el recuento bacteriano.

Entre todas las técnicas mostradas en la tabla I6 quizás sean la Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR) y la Fluorescencia con hibridación in situ (Fluorescence in situ hybridation, FISH), unas de las más empleadas, por ser buenas herramientas para conocer la compleja composición de la microflora gastrointestinal.

Tabla I6.- Técnicas de Biología Molecular que pueden ser aplicadas para el recuento y discriminación bacterianos (McCartney y Gibson, 1998).

Técnica	Breve descripción
Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)	Compara patrones de bandas tras la digestión de ADN cromosómico con endonucleasas
Electroforesis en gel con aplicación de campos eléctricos reorientados	Se utilizan enzimas de restricción para reducir el número de bandas por RFLP
Ribotipado	Permite identificar y clasificar bacterias en función de los genes del ADN ribosomal, marcado dentro de las bandas de RFLP
Secuenciación del ADN ribosomal	Comparación directa de secuencias de ADNr 16S con secuencias de ADNr amplificado por PCR
Polimorfismo de la longitud del ADN amplificado	RFLP amplificado por PCR
Amplificación directa	Amplificación de ADN bacteriano mediante PCR
Sondas genéticas	Detección y/o identificación de grupos microbianos específicos mediante el marcado con sondas. Ej: FISH
Marcado molecular	Uso de un código genético que permite la discriminación de determinados microorganismos en ecosistemas complejos

1.4.1. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR (Polymerase Chain Reaction), es una técnica que se describió en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular. Uno de los métodos más extensamente utilizados es el uso del ARNr 16S y sus genes como moléculas diana. Los cebadores específicos para PCR pueden diseñarse basándose en las diferentes regiones de esta molécula para detectar ciertas especies o grupos bacterianos predominantes en el tracto gastrointestinal (Wang y col., 1994; Matsuki y col., 2002). Hasta ahora, se han diseñado cebadores de oligonucleótidos específicos para muchas de las especies bacterianas conocidas del tracto gastrointestinal (Kauffman y col., 1997; Matsuki y col., 1999, 2002; Song y col., 2000; Walter y col., 2000). Estos cebadores son una herramienta muy útil para el seguimiento cualitativo de la microbiota intestinal pero, desafortunadamente, no proporcionaban información de tipo cuantitativa. Por ello, se desarrolló la PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR). La clave en la RT-qPCR reside en la posibilidad de detectar en tiempo real la amplificación del genoma a estudiar. Para llevar a cabo esta detección existen

varios métodos pero, casi todos, basados en la utilización de otro fragmento de ADN (sonda) complementario a una parte intermedia del ADN que queremos amplificar. Esta sonda lleva adherida una molécula fluorescente y otra molécula que inhibe esta fluorescencia (“quencher”), de tal forma que, sólo cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción de la ADN polimerasa, la molécula fluorescente se libera de la acción del “quencher” y emite fluorescencia al ser iluminada con un láser. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR es proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando. En general, para que esta técnica sea válida, requiere realizar en paralelo una curva patrón en las mismas condiciones para conocer la cantidad total de ADN que se está amplificando. Puesto que las bifidobacterias son unos de los microorganismos fecales predominantes, se han desarrollado un gran número de cebadores específicos para los diferentes géneros y especies.

Posteriormente, se han seguido desarrollando cebadores específicos para otros microorganismos constituyentes de la flora, tanto para los diferentes géneros como para las especies, dada la complejidad del ecosistema. Así, en el año 2004 ya se habían desarrollado y aplicado al análisis de la microflora gastrointestinal humana, cebadores específicos para los grupos bacterianos *Clostridium coccoides*, *Bacteroides fragilis*, *Bifidobacterium*, el subgrupo *Clostridium leptum* y para *Atopobium cluster*. El desarrollo de estos métodos permiten, cada vez más, profundizar en el conocimiento sobre la composición de la microbiota del tracto gastrointestinal, siendo una herramienta muy útil para llevar a cabo un seguimiento acerca de la eficacia de probióticos y prebióticos.

1.4.2. Fluorescencia con Hibridación *In Situ* (Fluorescent *In Situ* Hybridation, FISH)

La técnica de Fluorescencia con Hibridación *In Situ* (FISH) permite no sólo conocer la filogenia de las bacterias sino también su morfología, localización, abundancia y actividad. Estos objetivos, pueden alcanzarse gracias a la utilización de sondas de ácidos nucleicos cuyas dianas son regiones específicas de las moléculas de ARNr de las bacterias. Concretamente, se utilizan sondas de nucleótidos marcadas con un tinte fluorescente para detectar las regiones 16S del ARNr dentro de las células. La especie, el género, la familia y el dominio pueden ser determinados utilizando una sonda específica. Durante los últimos quince años, se han encontrado cientos de sondas de oligonucleótidos marcadoras de ARNr para la detección *in situ* de organismos procariotas, por ello se han centralizado en bases de datos que pueden consultarse online (<http://www.microbial-ecology.net/probebase>). La utilización de estas sondas y las condiciones de tratamiento adecuadas permiten detectar específicamente los

microorganismos fijados de manera adecuada pocas horas después del muestreo, bien de la manera más tradicional mediante microscopia de fluorescencia o microscopía confocal de barrido láser o de manera más moderna por métodos de recuento semiautomáticos. Además los “software” existentes son capaces de designar nuevas sondas de oligonucleótidos marcadoras de ARNr para FISH. Con objeto de aumentar la fiabilidad de la técnica, es recomendable utilizar más de una sonda para la detección de un microorganismo. Además, es posible aplicar, simultáneamente en el mismo experimento de hibridación, sondas marcadas con diferentes tintes fluorescentes. La Tabla I7 muestra las características de los fluorocromos utilizados más frecuentemente en FISH.

Tabla I7.- Longitudes de onda de emisión y de excitación de tintes fluorescentes adecuados para marcar las sondas de oligonucleótidos específicas para ARNr.

Fluorocromo	λ excitación (nm)	λ emisión (nm)	Color fluorescente
Oregon green 488	490,493	514,520	Verde
5(6)-carboxifluoresceín-N-hidroxisuccinimida ester (FLUOS)	492	518	Verde
Cy3	514	566	Rojo-anaranjado
Tetrametilrodamina isotiocianato (TRITC)	550	573	Rojo
Cy5	649	666	Próximo al infrarojo

A pesar de que la técnica ha sido exitosamente aplicada a un gran número de bacterias, presenta el problema de que no se puede emplear en muestras con una gran fluorescencia intrínseca, como por ejemplo en cianobacterias. De la misma manera tampoco es posible su utilización si las muestras contienen algún tipo de componente que absorba las sondas de oligonucleótidos marcadas. En estos casos la RT-qPCR está especialmente indicada.

OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2.1. OBJETIVOS

En la actualidad, los consumidores están cada vez más concienciados de la relación que hay entre la dieta y la salud lo que ha impulsado el desarrollo y la comercialización de alimentos con propiedades beneficiosas.

En los últimos años se observa con más frecuencia la introducción en el mercado de alimentos que contienen nuevos ingredientes con determinadas propiedades funcionales, tales como los oligosacáridos con propiedades prebióticas. Este hecho ha estimulado enormemente las investigaciones encaminadas al descubrimiento de nuevos oligosacáridos con propiedades prebióticas mejoradas.

Las nuevas técnicas de producción de oligosacáridos, descritas en la bibliografía, van orientadas sobre todo, a la utilización de enzimas mejoradas y a la utilización de nuevos sustratos. En este sentido **el objetivo** de esta tesis se ha centrado en la **obtención de nuevos oligosacáridos derivados de la lactulosa, con propiedades prebióticas mejoradas, mediante transgalactosilación utilizando diferentes β -galactosidasas.**

La lactulosa, isómero de la lactosa, es resistente a la acción de las enzimas digestivas y presenta unas reconocidas propiedades prebióticas, sin embargo, es sustrato de la microflora de la microflora en los primeros tramos del colon. Los oligosacáridos derivados de la lactulosa, al presentar mayor peso molecular, podrían alcanzar zonas más distales del colon donde es mayor la incidencia de determinadas patologías. Asimismo, se llevará a cabo un estudio sobre la influencia de la estructura química de los oligosacáridos derivados de la lactulosa, es decir el número de monómeros que contenga, la naturaleza de los mismos y el tipo de enlaces presentes, sobre las propiedades prebióticas.

Para alcanzar estos objetivos, se llevará a cabo el siguiente plan de trabajo.

2.2. PLAN DE TRABAJO

- I. Puesta a punto de la metodología analítica (HPAEC-PAD, HPLC-RI) necesaria para la determinación de oligosacáridos.
- II. Optimización de las condiciones de síntesis (pH, T, t, concentración de sustrato y concentración de enzima) de nuevos oligosacáridos derivados de lactulosa utilizando β -galactosidasas de diferentes orígenes (transgalactosilación).
- III. Optimización de las condiciones de obtención (T, t y concentración de catalizador) de nuevos oligosacáridos derivados de la lactulosa mediante la isomerización de mezclas de oligosacáridos derivados de la lactosa.
- IV. Identificación y caracterización de los nuevos oligosacáridos sintetizados a partir de lactulosa.
- V. Modelización de la formación de oligosacáridos a partir de lactulosa por transgalactosilación.
- VI. Determinación *in vitro* del efecto de los oligosacáridos sintetizados sobre microorganismos de la flora gastrointestinal. Cálculo del Índice Prebiótico.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. REACTIVOS

La lactulosa, D-galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-tagatosa, 4-galactobiosa, 6-galactobiosa, rafinosa, el orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), y los patrones de ácido acético, propiónico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico y caproico se adquirieron en Sigma-Aldrich Co. (Steinheim, Germany). La lactosa monohidrato y el metanol fueron suministrados por Scharlau (España). El aluminato sódico fue suministrado por Carlo Erba (Divisione Chimica Industriale, Milano, Italy). Para el fraccionamiento de oligosacáridos con pesos moleculares comprendidos entre 100-1.800 Da, se utilizó Bio Gel P-2 con tamaño de poro superior a 45 μ m (Bio-Rad) (Hemel Hempstead, Hertfordshire, UK). El producto comercial VivinalGOS fue un regalo de Borculo Domo (Hanzeplein, The Netherlands).

3.2. CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA

Para llevar a cabo las síntesis de oligosacáridos se emplearon las preparaciones comerciales de β -galactosidasa de *A. aculeatus* (Pectinex Ultra SP-L) y *K. lactis* (Lactozym 3000 L HP G) que fueron un regalo de Novozymes (Dittingen, Switzerland y Bagsvaerd, Denmark respectivamente) y la β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* adquirida en Sigma-Aldrich. La actividad de cada una de ellas se determinó tal y como se describe a continuación.

La actividad enzimática de la β -galactosidasa de *A. aculeatus* se determinó mediante la medida a 410 nm del color amarillo desarrollado por la reacción de la enzima con el ONPG a una concentración de 4,7 mM en 0,1 M de acetato sódico pH 5 a 40°C, (ϵ para orto-nitrophenol (410 nm) = 442 M⁻¹/cm), siendo los productos de reacción la galactosa y el orto-nitrofenol y el mecanismo similar al de la hidrólisis de la lactosa. La enzima se diluyó a la concentración adecuada utilizando el tampón indicado anteriormente. La disolución de ONPG se mantuvo a 40°C en un baño de agua antes de añadir la enzima. Así, la β -galactosidasa de *A. aculeatus* del preparado comercial Pectinex Ultra SP-L, expresa una actividad β -galactosidasa de 82,07 U, siendo 1 unidad (U) la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de ONP por minuto y por mL en las condiciones ensayadas.

La actividad específica se calculó dividiendo la actividad enzimática entre el contenido en proteína. El contenido en proteína del preparado Pectinex Ultra SP-L fue de 82 mg/mL. Dicho contenido se determinó mediante el método del BCA utilizando el BCA™ Protein assay kit de Thermo Scientific (Rockford, USA) (Smith y col., 1985). De esta manera, la actividad específica de la enzima resultó ser 1 μmol de ONP liberado/min/mg, es decir, 1 U/mg.

La actividad enzimática de la β -galactosidasa de *K. lactis* se calculó utilizando también ONPG como sustrato. La reacción se llevó a cabo a 40°C con una concentración de sustrato de 0,5 g/L en tampón fosfato 50 mM pH 6,5 y 1 mM de MgCl_2 , deteniéndose a los 2 minutos por adición de 1 mL 0,5 N de H_2SO_4 a 0,44 mL de muestra. Posteriormente, se añadió 1,5 mL de Na_2CO_3 1 M para desarrollar totalmente el color amarillo debido a la presencia del ONPG. El color se midió espectrofotométricamente a 420 nm (ϵ para o-nitrophenol (420 nm) = 4500 M^{-1}/cm). Así, Lactozym 3000 L HP G expresa una actividad β -galactosidasa de 3205 U. Una unidad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima que libera un 1 μmol de ONP por mL y por minuto a 40°C y pH 6,5.

El contenido en proteína para el Lactozym 3000L HP G fue de 36,3 mg/mL, valor que fue determinado de la misma forma que para el preparado Pectinex Ultra SP-L, empleando el BCA™ Protein assay kit de Thermo Scientific (Rockfors, USA). De esta manera, la actividad específica de la enzima resultó ser 88 U/mg.

En el caso de la β -galactosidasa de *A. oryzae*, se dispuso de la enzima tanto en forma soluble como inmovilizada por lo que la determinación de su actividad enzimática se llevó a cabo en las dos formas. La β -galactosidasa inmovilizada sobre un soporte de glutaraldehído-agarosa (Irazoqui y col., 2002) fue cedida por el grupo del profesor Batista de la Universidad de la República de Uruguay.

Para la determinación de la actividad de la enzima soluble, se pesaron 0,1 g y se disolvieron en 750 μL de tampón acetato sódico 0,1 M a pH 5. Se agitó a temperatura ambiente durante 30 min hasta su total disolución y se centrifugó posteriormente a 10000 rpm durante 10 min para luego tomar el sobrenadante y determinar la actividad. La actividad β -galactosidasa se determinó, entonces, mediante la medida a 410 nm del color amarillo desarrollado por la reacción de la enzima con ONPG a una concentración de 4,7 mM en 0,1 M de acetato sódico pH 5 a 40°C, (ϵ para o-nitrofenol (410 nm) = 442 M^{-1}/cm). La enzima se diluyó a la concentración adecuada utilizando el tampón indicado anteriormente. La disolución de ONPG se mantuvo a 40°C en un baño de agua antes de añadir la

enzima. Así, la β -galactosidasa de *A. oryzae* expresa una actividad β -galactosidasa de 9,43 U siendo 1 unidad (U) la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de ONP por minuto y por mg de sólido en las condiciones ensayadas.

En el caso de la enzima inmovilizada, se procedió de la misma manera que para el caso de la forma soluble. Así, se pesaron 0,1 gramos de derivado y se disolvieron en 750 μ L de tampón acetato 0,1 M pH 5. Se tomaron 50 μ L de la suspensión y se añadieron a una cubeta conteniendo 300 μ L de ONPG y 500 μ L de tampón acetato a 40°C. Las medidas de absorbancia se tomaron cada minuto agitando previamente la cubeta de forma manual. El valor de actividad de la β -galactosidasa inmovilizada de *A. oryzae* fue de 770,82 U siendo 1 unidad (U) la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de ONP por minuto y por g de soporte en las condiciones ensayadas.

Las medidas de las actividades enzimáticas se realizaron cinco veces siendo el error experimental, expresado como la desviación estándar relativa (RSD) para todas las β -galactosidasas, menor del 3%.

3.3. OBTENCIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS DERIVADOS DE LA LACTULOSA

3.3.1. Hidrólisis y transgalactosilación

3.3.1.1. Utilización de la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*

Las disoluciones de lactulosa se prepararon en 50 mM de tampón fosfato y 1 mM de $MgCl_2$. Las condiciones estudiadas para la optimización de la reacción fueron: temperatura (40 y 50 °C), pH (6,5 y 7,5), concentración de lactulosa (250, 450 y 650 g/L) y concentración de enzima (3, 6 y 9 U/mL). Las disoluciones de lactulosa se calentaron a la temperatura requerida antes de la adición de la enzima, manteniendo dicha temperatura durante todo el experimento. Las reacciones se llevaron a cabo en tubos eppendorf de 1,5 mL incubados en un agitador orbital a 300 rpm. Se retiraron alícuotas de 100 μ L a intervalos de 0, 2, 4, 6, 8 y 24 h. La inactivación de la enzima se llevó a cabo sumergiendo la mezcla de reacción en agua hirviendo durante 5 minutos. Posteriormente, las muestras se filtraron a través de filtros de nylon Millipore FH de 45 μ m (Bedford, MA) y se inyectaron 20 μ L en el cromatógrafo de líquidos (Apartado 3.5.2.1).

El estudio del posible efecto de inhibición de los productos de la reacción, fructosa y galactosa, en la transgalactosilación, se llevó a cabo de manera independiente. Así, 50, 100 y 150 g/L de cada monosacárido se añadieron a 250 g/L de una disolución de lactulosa en tampón fosfato 0,05 M pH 7,5 y 1 mM de MgCl_2 . La reacción se llevó a cabo a 40°C durante 6 h tomando muestra cada 2 h y, una vez finalizada, se procedió a la inactivación de la enzima mediante calentamiento, tal y como se ha mencionado anteriormente.

3.3.1.2. Utilización de la β -galactosidasa de *Aspergillus aculeatus*

Para la producción de oligosacáridos a partir de lactulosa con la β -galactosidasa de *A. aculeatus* presente en el preparado comercial Pectinex Ultra SP-L, se llevaron a cabo diferentes ensayos, en tampón acetato o fosfato 0,1 M (según el pH) estudiándose la influencia de distintos parámetros: concentración de lactulosa (250, 450, 650 y 850 g/L), pH (4,5, 5,5 y 6,5), concentración de enzima (8, 16 y 32 U/mL) y temperatura (40, 50 y 60°C). Las disoluciones de lactulosa se calentaron a la temperatura requerida antes de la adición de la enzima, manteniendo dicha temperatura durante todo el experimento. Las reacciones se llevaron a cabo en tubos eppendorf de 1,5 mL incubados en un agitador orbital a 300 rpm. Se tomaron alícuotas de 50 μL a diferentes tiempos (1, 3, 5, 7 y 24 h) sumergiéndolas inmediatamente en agua hirviendo durante 5 minutos para inactivar la enzima. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 9030 g durante 1 minuto, se llevaron a la concentración adecuada, se filtraron a través de filtros de nylon Millipore FH de 45 μm y se inyectaron 20 μL en el cromatógrafo de líquidos (Apartado 3.5.2.1). Las muestras utilizadas como control se prepararon de la misma manera añadiendo agua en lugar de la enzima. Todos los ensayos se realizaron por duplicado, siendo el volumen total de reacción en todos ellos de 525 μL .

Asimismo, se realizó un estudio sobre el posible efecto de inhibición de los productos de la reacción, fructosa y galactosa en la transgalactosilación, llevándose a cabo de la misma manera que en el caso de la β -galactosidasa de *K. lactis*. Para ello, se añadieron 50, 100 y 150 g/L de cada monosacárido a mezclas de reacción con una concentración de lactulosa de 250 g/L en tampón fosfato 0,1 M pH 6,5. La reacción se llevó a cabo a 60°C durante 6 h tomando muestra cada 2 h y, una vez finalizada, se procedió a la inactivación de la enzima, tal y como se ha indicado con anterioridad.

3.3.1.3. Utilización de la enzima β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*

3.3.1.3.1. Síntesis con la enzima soluble

Para la producción de oligosacáridos a partir de lactulosa con la forma soluble de la β -galactosidasa de *A. oryzae*, se llevaron a cabo diferentes ensayos, en tampón acetato o fosfato 0,1 M (según el pH) estudiándose, a una concentración de lactulosa determinada (450 g/L), la influencia de parámetros tales como concentración de enzima (8 y 16 U/mL), temperatura (40, 50 y 60°C) y pH (4,5 y 6,5). Las disoluciones de lactulosa se calentaron a la temperatura requerida antes de la adición de la enzima, manteniendo dicha temperatura durante todo el experimento. Al igual que en los casos anteriores, las reacciones se llevaron a cabo en tubos eppendorf de 1,5 mL incubados en un agitador orbital a 300 rpm. Se tomaron alícuotas de 50 μ L a diferentes tiempos (1, 3, 5, 7 y 24 h), sumergiéndolas inmediatamente en agua hirviendo durante 5 minutos para inactivar la enzima. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 9030 g durante 1 minuto y se llevaron a la concentración adecuada para filtrarse, finalmente, a través de filtros de nylon Millipore FH de 45 μ m e inyectar 20 μ L en el cromatógrafo de líquidos (Apartado 3.5.2.1). Las muestras utilizadas como control se prepararon de la misma manera añadiendo agua en lugar de la enzima. Todos los ensayos se realizaron por duplicado, siendo el volumen total de reacción en todos ellos de 525 μ L.

3.3.1.3.2. Síntesis con la enzima inmovilizada

En el caso de la enzima inmovilizada, y para comparar resultados con la enzima soluble, los ensayos se realizaron bajo las mismas condiciones de reacción. Las reacciones se llevaron a cabo en tubos eppendorf de 1,5 mL incubados en un agitador orbital a 1000 rpm, para evitar la sedimentación de la enzima en el fondo del tubo. Utilizando una micropipeta con un filtro en la punta para evitar coger parte de la enzima inmovilizada, se tomaron alícuotas de 50 μ L a diferentes tiempos (1, 3, 5, 7 y 24 h). Posteriormente, se llevaron a la concentración adecuada para filtrarse posteriormente a través de filtros de nylon Millipore FH de 45 μ m e inyectar 20 μ L en el cromatógrafo de líquidos (Apartado 3.5.2.1). Las muestras utilizadas como control se prepararon de la misma manera añadiendo agua en lugar de la enzima. Todos los ensayos se realizaron por duplicado, siendo el volumen total de reacción en todos ellos de 525 μ L.

3.3.2. Obtención mediante isomerización de galactooligosacáridos (GOS) sintetizados

3.3.2.1. Hidrólisis y transgalactosilación de la lactosa

Para la producción de GOS a partir de la lactosa con la β -galactosidasa de *A. aculeatus*, se añadieron 16 U/mL de enzima a una disolución de lactosa (300 g/L) preparada en tampón fosfato 0,1 M pH 6,5, llevando a cabo la reacción a 60°C en un agitador orbital a 300 rpm durante 7 h. Transcurrido este tiempo la mezcla de reacción se sumergió en un baño de agua hirviendo durante 5 min para inactivar la enzima.

La síntesis de GOS a partir de lactosa utilizando la β -galactosidasa de *K. lactis* se llevó a cabo añadiendo 3 U/mL de β -galactosidasa a una disolución de lactosa (250 g/L) en tampón fosfato 0,05 M y $MgCl_2$ a pH 7,5. La reacción se realizó a cabo a 40°C en un agitador orbital a 300 rpm y el tiempo de reacción fue de 2 h. Transcurrido este tiempo se inactivó la enzima del mismo modo que para el caso de la síntesis con la β -galactosidasa de *A. aculeatus*.

3.3.2.2. Isomerización de los galactooligosacáridos sintetizados

Los ensayos de isomerización de la mezcla de GOS obtenida como se ha indicado anteriormente se llevaron a cabo según el método de Zokaee y col. (2002). Así, 1 g de mezcla de reacción obtenida a partir de lactosa se disolvió en agua destilada y se mezcló con el catalizador aluminato sódico en diferentes proporciones, siendo las relaciones molares aluminato sódico/lactosa 2:1, 3:1 y 4:1. Las mezclas obtenidas se llevaron a 10 mL con agua destilada y se introdujeron en un baño de agua ajustado a la temperatura de reacción (40, 45 y 50°C). Las reacciones de isomerización se llevaron a cabo por duplicado y se tomaron alícuotas de 500 μ L a 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11 y 24 h, parándose la reacción por inmersión en un baño de agua-hielo y añadiendo unas gotas de HCl hasta neutralizar el pH. A continuación, las muestras se llevaron, con agua, hasta un volumen de 3 mL, se centrifugaron a 9030 g durante 5 min y el sobrenadante se diluyó 50 veces para llevar a cabo su análisis por cromatografía de líquidos (Apartado 3.5.2.1).

La alolactulosa se obtuvo de la misma manera a partir de la alolactosa y se utilizó como patrón. Previamente, la alolactosa se aisló de la mezcla de GOS mediante HPLC-RI y se caracterizó por RMN.

3.3.3. Isomerización de la mezcla de galactooligosacáridos comercial VivinalGOS

Los ensayos de isomerización con la mezcla de GOS comercial VivinalGOS se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones de reacción: 1 g de la mezcla de carbohidratos se mezcló con 0,7 g de aluminato sódico en 10 mL de agua incubándose la mezcla a 40°C durante 9 h. Transcurrido este tiempo, se paró la reacción con HCl hasta neutralizar el pH. La mezcla se centrifugó a 9030 g durante 15 min y se recogió el sobrenadante que se evaporó en rotavapor hasta sequedad. El residuo se reconstituyó en 4 mL de agua y se analizó por cromatografía de líquidos (Apartado 3.5.2.1)

3.4. ESTUDIOS DE FERMENTACIÓN *IN VITRO* DE LOS OLIGOSACÁRIDOS SINTETIZADOS

3.4.1.- Crecimiento en cultivos de microorganismos puros

Para llevar a cabo el estudio de fermentabilidad con cultivos de microorganismos puros se utilizaron trisacáridos puros aislados por HPLC-RI (Apartado 3.5.1.3) Las cepas bacterianas empleadas fueron *Streptococcus salivarius* ZL50-7, *Lactobacillus reuteri* R13, *Lactobacillus fermentum* Lc40, *Lactobacillus plantarum* CLB7, *Lactobacillus salivarius* CELA2, *Lactobacillus animalis* PDA1, *Lactobacillus murinus* PYH2 y *Bifidobacterium breve* 26M2 pertenecientes a la colección de cultivos del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Complutense de Madrid. Las cepas de *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LC-01, *Bifidobacterium lactis* BB12 se purificaron a partir de un producto simbiótico comercial (Symbiotic Drink; Priégola, Madrid, España) en el Departamento de Ciencia y Tecnología de Productos Lácteos del Instituto del Frío (CSIC). Todos los cultivos se mantuvieron a -80°C en medio MRS (Pronadisa, Madrid, España), o en el caso de *S. salivarius* ZL50, en medio M17, ambos suplementados con glicerol (40% v/v) y se subcultivaron en medio MRS ó M17 antes de su utilización en los ensayos de fermentación.

Los medios básicos utilizados para los estudios de fermentabilidad de los oligosacáridos sintetizados fueron caldo MRS de fermentación, sin glucosa ni extracto de carne (De Man y col., 1960), enriquecido con 0,2 % de Tween 80, 0,8 % de hidrolizado ácido de caseína y 0,05 % de cisteína, o caldo E.S.T.Y. (Pronadisa) sin fuente de carbono. Estos medios se suplementaron con 0,3 % (p/v)

de los oligosacáridos sintetizados 6'-galactosil-lactosa, 6'-galactosil-lactulosa, 4'-galactosil-lactosa, 4'-galactosil-lactulosa y 1-galactosil-lactulosa. Como controles de crecimiento se utilizaron lactosa y lactulosa. Cada carbohidrato se pesó en un tubo estéril al que se le añadió el medio de cultivo estéril correspondiente. Posteriormente, la solución se esterilizó mediante filtración a través de una membrana de 0,22 μm .

3.4.1.1. Ensayos de fermentación y evaluación del crecimiento bacteriano

Las cepas bacterianas se cultivaron durante toda la noche al 1% en medio MRS ó M17. Estos cultivos se diluyeron 10 veces en caldo MRS de fermentación ó caldo E.S.T.Y (ambos sin fuente de carbono), empleándose dichas diluciones como inóculo para evaluar el crecimiento de las cepas con los oligosacáridos puros derivados de lactosa ó lactulosa como única fuente de carbono. Para ello, 300 μL de las distintas soluciones de medio básico y el carbohidrato se dispusieron por duplicado en los pocillos de una microplaca estéril con tapa (Sarstedt Inc., Newton, USA), añadiéndose un 1% del inóculo diluido de cada cepa en cada uno de los pocillos. Todas las cepas se incubaron en condiciones aeróbicas a 37°C durante 48 h excepto *L. acidophilus* LA-5, *B. breve* 26M2, *B. lactis* BB12, que se incubaron en condiciones anaeróbicas (Gas-Pack, Anaerogen; Oxoid Ltd., Hampshire, England). Las densidades ópticas (DO_{600}) de las cepas aeróbicas se midieron a intervalos de tiempo comprendidos entre 20 y 60 min con un lector automático de microplacas (Varioskan Flash, Thermo Electron corporation, Vantaa, Finland) a 600 nm. Las velocidades máximas de crecimiento (μ_{max}) y el tiempo de latencia (lag) se calcularon ajustando las curvas a un modelo sigmoideal utilizando el programa Microsoft Excel add-in DMfit (Barayni and Roberts, 1994) (disponible en <http://www.ifr.ac.uk/safety/DMfit/default.html>). En el caso de la cepa anaeróbica, la DO_{600} se midió a 0, 24 y 48 h.

3.4.2. Crecimiento de bacterias en cultivos mixtos de muestras fecales humanas

3.4.2.1. Determinación del carácter bifidogénico

Estos ensayos se realizaron con fracciones con $\text{DP} \geq 3$ obtenidas de la purificación de las mezclas de oligosacáridos derivados de la lactulosa y de la mezcla comercial VivinalGOS.

3.4.2.1.1. Ensayos de fermentación

Los ensayos de fermentación *in vitro* se llevaron a cabo, por duplicado, utilizando muestras fecales de 3 voluntarios adultos sanos (dos mujeres y un hombre, de entre 30 y 40 años), que no habían tomado antibióticos durante al menos los 6 meses anteriores y sin ningún desorden de tipo gastrointestinal, utilizando, para ello, un medio basal libre de carbohidratos (CFBM) descrito por Al-Tamini y col. (2005). La preparación de los carbohidratos se llevó a cabo distribuyendo el CFBM en 8 tubos diferentes (2,5 mL por tubo) con un contenido de 15 mg de las diferentes fuentes de carbono a estudiar: oligosacáridos con $DP \geq 3$ derivados de lactosa o lactulosa, fracción de VivinalGOS con $DP \geq 3$ y lactulosa así como lactosa y glucosa que se utilizaron como carbohidratos de referencia. Un tubo adicional se mantuvo sin fuente de carbono y se empleó como control negativo. Tras la disolución completa de los carbohidratos, la mezcla se esterilizó por filtración a través de una membrana de 0,45 μm . Antes de la utilización de los carbohidratos, éstos se mantuvieron en anaerobiosis durante toda la noche a 37°C.

Los inóculos de heces se prepararon se diluyeron separadamente al 10% (w/v) en 0,17 M de tampón fosfato salino (PBS) pH 7,3 y se homogeneizaron en un digestor Lab-Blender 400 (Seward Medical, London, UK) durante 2 min. Estos homogeneizados (10 mL) se vertieron en 90 mL de CFBM y se mantuvieron durante toda la noche a 37°C en condiciones de anaerobiosis.

Pasado este tiempo, 2,5 mL de los distintos homogeneizados fecales se añadieron tanto al tubo control como a los que contenían las diferentes fracciones de carbohidrato a estudio (2,5 mL) (previamente preparados) siendo la concentración final de cada carbohidrato del 0,3 % (p/v). Realizadas las mezclas, las fermentaciones se llevaron a cabo a 37°C en condiciones de anaerobiosis (10% (v/v) H_2 , 10% CO_2 y 80% N_2) en una cámara Mac 500 (Don Whitley Scientific, West Yorkshire, UK). Se hicieron diferentes tomas de muestra a 0, 8 y 24 h de incubación y las muestras se centrifugaron a 12000 g durante 10 min. Tanto el residuo sólido como el sobrenadante se guardaron los para análisis posteriores.

3.4.2.1.2 Cuantificación de la población de bifidobacterias por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)

La cuantificación de la población de bifidobacterias se llevó a cabo por RT-qPCR utilizando marcadores específicos de género descritos previamente (Gueimonde y col., 2004). El aislamiento de ADN se llevó a cabo con el kit

comercial QIAamp DNA stool Mini kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany) de acuerdo con las condiciones del fabricante.

Todas las reacciones se realizaron en cápsulas MicroAmp selladas con sus correspondientes tapones (Applied Biosystems) utilizando el SYBR Green Master Mix (Applied biosystems). 1 μ L de ADN purificado se utilizó como plantilla en la reacción de PCR (25 μ L). El ciclado térmico consistió en un ciclo inicial de 10 min a 95°C seguido de 40 ciclos de 15 s a 95°C y 1 min a 60°C. La curva patrón se realizó con la cepa *Bifidobacterium longum* NCIMB8809 que se creció durante la noche en MRSC bajo condiciones anaeróbicas. Se representaron los valores totales de ciclo umbral (Ct) obtenidos para dicho cultivo patrón frente al logaritmo decimal del número inicial de células en el cultivo determinado por recuento en placa. El número de células de *Bifidobacterium* en las muestras fecales se determinó comparando los valores de ciclo umbral (Ct) obtenidos con la curva patrón. Las muestras se analizaron en duplicado en, al menos, dos análisis independientes por PCR para cada experimento de fermentación.

3.4.2.2. Determinación *in vitro* del carácter prebiótico de los oligosacáridos sintetizados

3.4.2.2.1. Ensayos de fermentación

Los ensayos de fermentación se llevaron a cabo utilizando muestras fecales de 3 voluntarios adultos sanos (dos hombres y una mujer, de entre 25 y 30 años), que no habían tomado antibióticos durante al menos los 6 meses anteriores y sin ningún desorden de tipo gastrointestinal.

El medio de cultivo (20 mL) utilizado estaba compuesto por (agua de peptona (Oxoid) 2 g/L, extracto de levadura (Oxoid) 2 g/L, NaCl (BDH) 0,01 g/L, K₂HPO₄ (BDH) 0.04 g/L, KH₂PO₄ (BDH) 0.04 g/L, MgSO₄·7H₂O (BDH) 0.01 g/L, CaCl₂·2H₂O (BDH) 0.01 g/L, NaHCO₃ (BDH) 2 g/L, Tween 80 (BDH) 2 mL/L, Hemina (Sigma, Dorset, UK) 5 mg/L, vitamina K1 (Sigma) 10 μ L/L, Cisteína-HCl 0.5 g/L, sales biliares (Oxoid) 0.05 g/L, Resazurina (Sigma) 1 mg/L). Dicho medio se inoculó con 2 mL de un homogeneizado de heces (1% p/v) diluido con PBS (1:10). Posteriormente se le añadió al medio ya inoculado, 200 mg de mezcla de oligosacáridos, para alcanzar una concentración final de 1% (p/v). Los vasos de fermentación (80 mL) se mantuvieron en todo momento bajo condiciones anaeróbicas gracias a un suministro continuo de nitrógeno libre de oxígeno. La temperatura se mantuvo a un valor constante de 37°C y a un pH de 6,5 controlado mediante un dispositivo que añadía NaOH (1 M) o HCl (1 M)

según fuese necesario. Se hicieron diferentes tomas de muestra a 0, 5, 10 y 24 h, cogiendo 750 μL para realizar el análisis por FISH y 500 μL para la determinación de SCFAs. En la Figura M1 se muestra una imagen de los fermentadores utilizados.

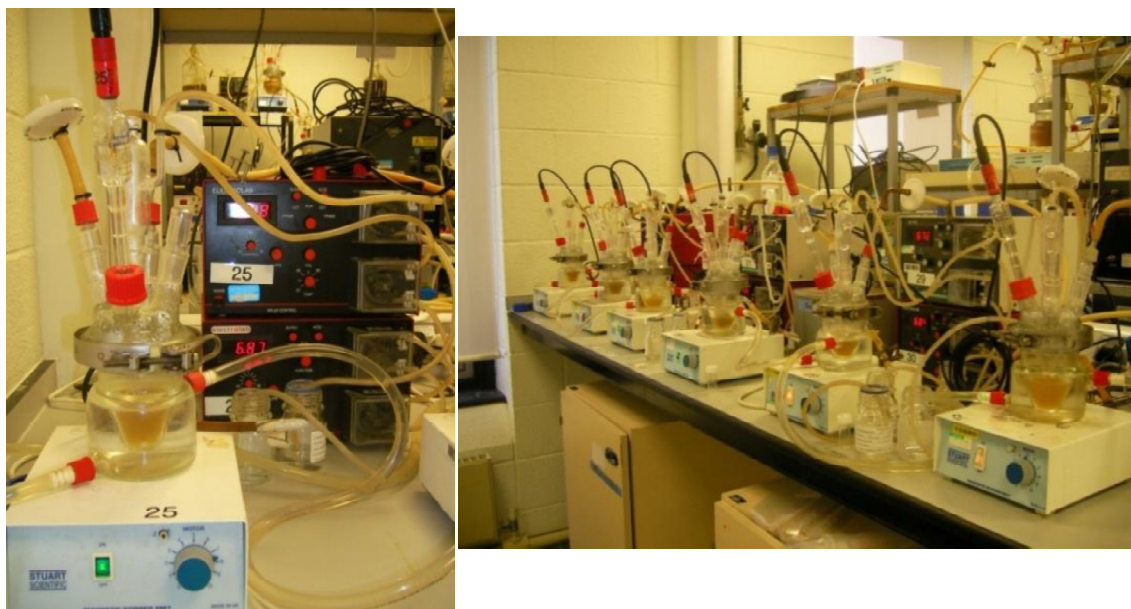


Figura M1.– Sistema de fermentación *in vitro* de los oligosacáridos a estudio con las bacterias procedentes de muestras fecales.

3.4.2.2.2. Cuantificación de las poblaciones bacterianas mediante fluorescencia con hibridación *in situ* (FISH)

Las poblaciones bacterianas se cuantificaron utilizando FISH con sondas de oligonucleótidos específicos para cada género de bacterias. Dichas sondas comerciales se marcaron con el colorante fluorescente cianina 3 (Cy3; excitación λ 514 nm; emisión λ 566 nm; color fluorescente, rojo-anaranjado. (Sigma Genosys, UK). Las sondas utilizadas y previamente validadas por otros autores fueron, Lab158 (Harmsen y col., 1999) específico para *Lactobacillus/Enterococcus*; Bif164 (Langendijk y col., 1995) específico para *Bifidobacterium* spp.; Bac303 (Manz y col., 1996) específico para *Bacteroides/Prevotella* grp; His150 (Franks y col., 1998) específico para *Clostridium* clusters I and II (including *Clostridium perfringens* / *Clostridium histolyticum*); Ato291 específico para *Atopobium* (*Coriobacterium* group) (Harmsen y col., 2000) y Erec 482 específico para *Eubacterium* (*Clostridium coccoides/Eubacterium rectale* group) (Franks y col., 1998). Para el recuento de las

bacterias totales se utilizó el ácido nucleico teñido 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Sigma).

Para llevar a cabo el recuento de las distintas poblaciones bacterianas por FISH, en primer lugar, hay que fijar las células, para ello, 1,5 mL de muestra se incubó con 375 μ L de 4% (p/v) de paraformaldehído durante 4 h a 4°C. Tras la fijación, las células se centrifugaron a 8973 *g* durante 5 minutos, se lavaron dos veces con 1 mL de tampón fosfato salino (PBS; 0,1 M, pH 7,0), se resuspendieron en una mezcla de 300 μ L de PBS / 99% etanol (1:1 v/v) y se almacenaron a -20°C para posteriores análisis. La suspensión de células se diluyeron en PBS/SDS y 20 μ L de dicha dilución se añadieron a un porta de Teflón/ poli-L-lisina con una capacidad para 6 muestras (Tekdon Inc. USA). Las muestras se fijaron en dicho porta por medio de calor (46-50°C) durante 15 min y, posteriormente, se deshidrataron en alcohol (50, 80, 96% etanol; 3 min cada uno). Este proceso permite la rotura de la membrana celular para que la sonda fluorescente penetre en la célula y marque de manera específica las bacterias. Una vez rota la membrana celular, se añadieron 50 μ L de la mezcla de hibridación (45 μ L de tampón de hibridación y 5 μ L de sonda por cada muestra) a cada una de las muestras en el porta. La hibridación se llevó a cabo durante 4 h en un incubador de microarrais (Grant-Boekel, Cambridge, UK) a la temperatura adecuada en función de la sonda empleada. Para el recuento de bacterias totales con DAPI, se dejaron hibridar las muestras a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después de la hibridación, cada uno de los portamuestras se lavó con un tampón de lavado durante 15 min a la misma temperatura que la de hibridación y, transcurrido este tiempo, se sumergieron durante 3 min en agua fría para evitar cristalización, secándose finalmente con aire comprimido. Después, 5 μ L de ProLong® Gold antifade reagent (Invitrogen Ltd., Paisley, UK) se añadieron a cada muestra y se cubrieron con un cubreobjetos (20 mm) (VWR, Lutterworth, UK). El porta se almacenó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 24 h y se examinó en un microscopio equipado con una lámpara fluorescente (Nikon Eclipse, E400). Las células teñidas con DAPI se examinaron bajo luz ultravioleta y las células hibridadas se visualizaron utilizando un filtro DM510. Para la enumeración de las bacterias se eligieron aleatoriamente al menos un mínimo de 15 zonas para cada filtro.

La medida cuantitativa general del efecto de los oligosacáridos en el crecimiento de la flora intestinal, se calculó mediante el cálculo del índice prebiótico (PI), propuesto previamente por Palframan y col. (2003). El PI constituye una relación entre los cambios producidos en aquellas bacterias “beneficiosas” para la salud humana (bifidobacterias, lactobacilos y eubacterias) y las que son consideradas como “perjudiciales” (clostridias y bacteroides),

refiriendo dichos cambios a los niveles iniciales. La ecuación que se empleó fue la siguiente:

$$PI = \alpha + \beta + \gamma - \delta - \varepsilon - \phi$$

$$\alpha = (\text{Bif}_{10}/\text{Bif}_0)/\text{total}$$

$$\beta = (\text{Lac}_{10}/\text{Lac}_0)/\text{total}$$

$$\gamma = (\text{EREC}_{10}/\text{EREC}_0)/\text{total}$$

$$\delta = (\text{Bac}_{10}/\text{Bac}_0)/\text{total}$$

$$\varepsilon = (\text{His}_{10}/\text{His}_0)/\text{total}$$

$$\phi = (\text{ATO}_{10}/\text{ATO}_0)/\text{total}$$

Donde: 0= 0 horas de fermentación; 10= 10h de fermentación; total= Bacterias totales (10 h)/Bacterias totales (0 h), Bif: *Bifidobacteria*; Lac: *Lactobacillus*; EREC: *Eubacteria*; Bac: *Bacteroides*; His: *Clostridium histolyticum*, ATO: *Atopobium*

3.5. TÉCNICAS ANALÍTICAS

3.5.1. Fraccionamiento de oligosacáridos

3.5.1.1. Tratamiento con carbón activo

Con objeto de eliminar todos los monosacáridos y la mayor parte de los disacáridos, las mezclas de síntesis se sometieron a un proceso de purificación utilizando carbón activo (Darco G66 100 mesh, Sigma). Así, 2 mL de mezcla de reacción, con un contenido en 0,5 g de carbohidratos se llevó hasta un volumen total de 100 mL de agua y se agitó durante 30 min con 3 g de carbón activo. A continuación la mezcla se filtró a vacío a través de un papel Whatman No.1, lavándose, el carbón, con 50 mL de agua. El proceso se repitió 3 veces para la eliminación total de los monosacáridos y de una parte de los disacáridos. Los

oligosacáridos, adsorbidos en el carbón se extrajeron por agitación con una mezcla al 50% (v/v) etanol/ agua y posterior filtración. El proceso se repitió varias veces hasta la extracción total de los oligosacáridos mezclando todas las soluciones para su posterior evaporación en un rotavapor (Büchi, Switzerland). Las fracciones secas de oligosacáridos se purificaron de nuevo por HPLC-RI para la obtención de los compuestos individuales puros, tal y como se refleja en el apartado 3.5.1.3.

3.5.1.2. Cromatografía de exclusión molecular (SEC)

El fraccionamiento de las mezclas de reacción obtenidas mediante síntesis enzimática con β -galactosidasas de *K. lactis* y *A. aculeatus*, se realizó por cromatografía de exclusión molecular siguiendo el método de Urashima y col. (1999). Para ello, se utilizó una columna de 100 x 2,5 cm y Bio Gel P-2 (< 45 μ m) como fase estacionaria. La elución se realizó con agua destilada a un flujo de 15 mL/h. En primer lugar, se realizó un calibrado con 2 mg de galactosa, lactosa y rafinosa, siendo los porcentajes de recuperación 65%, 110% y 105%, respectivamente. A continuación, se introdujeron, en la columna, las muestras correspondientes y se recogieron fracciones de 5 mL mediante un colector de fracciones Frac-920 (Amersham Biosciences). Las fracciones recogidas se analizaron finalmente por HPAEC-PAD (método B; Apdo. 3.5.2.1).

3.5.1.3. Cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de índice de refracción (HPLC-RI)

Las mezclas de oligosacáridos se purificaron mediante cromatografía semipreparativa utilizando un equipo formado por una bomba (Waters) y un módulo de desgasificación Dionex, un detector RID-10A Shimadzu y una columna semipreparativa Kromasil NH₂ (250 mm x 10 mm) de Alltech. La fase móvil empleada fue una mezcla acetonitrilo:agua 75:25 siendo el flujo de 4 mL/min. Para conocer los tiempos de retención de mono-, di- y trisacáridos se utilizaron patrones de galactosa, fructosa, lactulosa y rafinosa. Así, los oligosacáridos de interés se purificaron recogieron a la salida del detector, para posteriormente caracterizarlos por MS (Apartado 3.5.4.1) y RMN (Apartado 3.5.4.2).

3.5.2. Determinación de carbohidratos

3.5.2.1. **Cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detección amperométrica de pulsos (HPAEC-PAD)**

El análisis de los oligosacáridos sintetizados, así como del resto de carbohidratos presentes en las mezclas de reacción se llevó a cabo por HPAEC-PAD en un equipo Dionex ICS2500 formado por una bomba GP50, un detector electroquímico ED50 con electrodo de trabajo de oro y un electrodo de referencia de Ag/AgCl. La adquisición y tratamiento de datos se realizó con el software Chromeleon 6,7 (Dionex Corp. Sunnyvale, C.A.). Las separaciones se realizaron a temperatura ambiente y para la preparación de la fase móvil se usaron, agua ultrapura, NaOH al 50% (p/v) (Fluka, Steinheim, Germany) y NaOAc (Panreac, Barcelona, España).

La separación de los carbohidratos se llevó a cabo utilizando tres métodos. En el **método A** se empleó una columna CarboPac PA-10 (4 x 250 mm) con precolumna CarboPac PA-10 (4 x 50 mm). La elución de los oligosacáridos se llevó a cabo en gradiente combinando 3 eluyentes de la siguiente manera: 70% de A (12,5 mM NaOH) y 30% de B (8 mM NaOAc) desde 0 a 3,5 min; 26% de A, 70% de B y 4% de C (125 mM NaOH) de 16,5 a 35 min. Transcurrido este tiempo la columna se lavó con 50% de A y 50% de B durante 10 min y se reequilibró a las condiciones iniciales durante 10 min. El flujo empleado fue de 1 mL/min. El tiempo de detección y los valores de voltaje fueron: $E_1 = 0,1V$ ($t_1 = 400ms$), $E_2 = -0,2V$ ($t_2 = 10 ms$), $E_3 = 0,6V$, $E_4 = -0,1V$ ($t_4 = 60 ms$), ($t_t = 500 ms$) (Dionex, 2001).

En el **método B** (Splechtna y col., 2006), se empleó una columna CarboPac PA-10 (4 x 250mm) con precolumna CarboPac PA-1 (4 x 50 mm). La elución de los oligosacáridos se llevó a cabo en gradiente combinando dos eluyentes de la siguiente manera: 100% A (100 mM NaOH) de 0 a 20 minutos y 100% de B (50 mM NaOAc y 100 mM NaOH) de 20 a 70 min. Transcurrido ese tiempo la columna se lavó con 100% de C (100 mM NaOH y 1 M NaOAc) durante 10 min y, finalmente, se mantuvo durante 15 min en las condiciones iniciales. El flujo empleado fue de 1 mL/min. El tiempo de detección y los valores de voltaje fueron los mismos que para el método A.

En el **método C**, la determinación de los oligosacáridos también se llevó a cabo utilizando una columna CarboPac PA-1 y una precolumna CarboPac PA-1 usando una combinación de dos eluyentes. Eluyente A (100 mM NaOH) y eluyente B (H_2O) se combinaron de la siguiente manera: 95% B y 5% A de 0 a 20 min y 90% de B y 10% A de 23 a 75 min. Posteriormente, se pasó a 100% del

eluyente C (100 mM de NaOH y 1 M de NaOAc) para lavar la columna durante 10 min. A continuación se procedió al equilibrio de la misma durante 30 min en las condiciones iniciales. El flujo empleado fue de 1,5 mL/min y el tiempo de detección y los valores de voltaje los mismos que para los otros métodos utilizados.

La cuantificación de cada uno de los carbohidratos, en las mezclas de reacción, se llevó a cabo mediante el método de la calibración externa. Los patrones empleados fueron galactosa, glucosa, fructosa, tagatosa, lactosa, lactulosa y rafinosa. En cada caso se construyeron las curvas de calibrado correspondientes al representar el área de cada pico frente a la concentración, para cada uno de los patrones. Los coeficientes de regresión para las curvas fueron siempre superiores a 0,99. Los oligosacáridos formados se expresaron con rendimientos calculados como porcentaje en peso del carbohidrato correspondiente, teniendo en cuenta la cantidad total de azúcares presentes en la mezcla de reacción.

3.5.3. Determinación de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs)

3.5.3.1. Cromatografía de gases (GC)

Los SCFAs de los sobrenadantes de cultivos fecales realizados tal y como se describe en el Apartado 3.4.2.1.1 se cuantificaron mediante CG. Para ello, los sobrenadantes libres de células se filtraron a través de un filtro de 0,2 μm y se mezclaron con el patrón interno etil-butírico (2 mg/mL) en relación 1:10. Las muestras se analizaron inmediatamente en un cromatógrafo GC6890N con un detector de ionización en llama (FID) (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA) acoplado con un inyector automático 7683B Series (Agilent). Los datos se procesaron con el software Agilent Chemstation. La separación de los ácidos grasos se realizó utilizando una columna capilar HP-FFAP (25 m x 0,32 mm; 0,52 μm espesor; Agilent). Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: 130°C, 5°C/min hasta 180°C y 20°C/min hasta 220°C para el acondicionamiento de la columna. La temperatura del inyector y del detector fue de 220°C y 250°C, respectivamente. La relación de split fue 30:1. La concentración (ng/mL) de cada ácido graso (láctico, acético, propiónico, butírico e isobutírico) se calculó utilizando ecuaciones de regresión lineal ($R^2 \geq 0,99$) correspondientes a las curvas patrón obtenidas con seis concentraciones diferentes.

3.5.3.2. Cromatografía de líquidos (HPLC)

El análisis de los SCFA resultantes de las fermentaciones *in vitro* descritas en el Apartado 3.4.2.2.1 se llevó a cabo por HPLC tal y como se detalla a continuación. Las muestras (500 μ L) se centrifugaron a 13400 *g* durante 5 min para eliminar las bacterias y la materia particulada. El sobrenadante (30 μ L) se analizó por HPLC-RI. La columna empleada fue una columna para ácidos orgánicos, Phenomenex PCOA (Phenomenex, Chester, UK). El eluyente utilizado, H_2SO_4 (0,005 M), se desgasificó con helio y se empleó a un flujo de 0,6 mL/min. La columna se termostatizó a 85°C. La calibración se realizó por el método del patrón externo utilizándose como patrones los ácidos láctico, acético, propiónico, isobutírico, butírico, isovalérico y valérico.

3.5.4. Caracterización estructural de los oligosacáridos sintetizados

3.5.4.1. Espectrometría de masas (MS)

El análisis por MS se realizó en las fracciones más puras de oligosacáridos recogidas a la salida del detector de índice de refracción (Apartado 3.5.1.3) y de las obtenidas por exclusión molecular (Apartado 3.5.1.2). Los espectros de masas se registraron utilizando un cuadrupolo HP 1100 en modo electrospray positivo (API-ES). Los valores de voltaje capilar, temperatura del gas, flujo del gas de secado y presión del nebulizador fueron 4000V, 330°C, 10 L/min y 40 psi, respectivamente. La adquisición de datos se realizó en modo de scan (de 100 a 1500 uma) extrayéndose posteriormente las trazas correspondientes al ión $\text{M} + \text{H}^+$ a través de un sistema HP Chem Station (Hewlett Packard).

3.5.4.2. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Las estructuras químicas de los compuestos mayoritarios (trisacáridos) aislados de las mezclas de reacción con Pectinex Ultra SP-L y Lactozym 3000 L HP G, empleando lactosa y lactulosa como sustrato se identificaron mediante RMN de carbono (^{13}C) y de protón (^1H). Los espectros se realizaron en D_2O a 125 y 500 MHz, respectivamente, en un equipo Varian VNMRS-500 equipado con una sonda fría de HCN de 5 mm. En todos los casos se realizó un espectro de ^1H y de ^{13}C a 293 K en D_2O (100% atom %D, Fluka, Steinheim, Germany). Los desplazamientos químicos de ^1H se referenciaron a la señal residual del disolvente a δ 4,70 (D_2O).

Con objeto de identificar las estructuras de los trisacáridos se llevaron a cabo experimentos monodimensionales y bidimensionales. Para los espectros monodimensionales (1D- ^1H , 1D- ^{13}C y 1D TOCSY) se utilizaron secuencias de pulsos estándar. Los experimentos bidimensionales homonucleares consistieron en experimentos gCOSY, que establece correlaciones entre los núcleos de ^1H ; TOCSY, que permiten identificar caminos de acoplamiento y ROESY, que da una medida de la proximidad de los núcleos. Dichos experimentos, se llevaron a cabo, para los dos primeros casos con un tiempo de espera entre acumulaciones de 1 s, una anchura espectral de 3000 Hz en ambas dimensiones, 4096 puntos complejos en t_2 y 4 acumulaciones para cada uno de los 256 incrementos de tiempo, y una predicción lineal a 512 puntos. Los datos se completaron de 0 a 4096×4096 puntos reales. Para el caso de los experimentos ROESY, se usaron las mismas condiciones pero con 64 acumulaciones para cada incremento y un tiempo de mezcla de 200 ms.

Por otro lado, los experimentos bidimensionales heteronucleares que se llevaron a cabo fueron gHSQC, que permiten establecer la correlación ^1H - ^{13}C a un a través de la constante de acoplamiento a un enlace y gHMBC, que establece las correlaciones a dos y tres enlaces. Para dichos experimentos se empleó la misma ventana espectral de ^1H , una ventana espectral de 15000 Hz, 1 s de tiempo de espera entre acumulaciones, 1024 puntos, y 256 incrementos, con una predicción lineal a 512 puntos. Se realizó un rellenado de 0 para conseguir 4096×4096 puntos reales. El número de acumulaciones, en la segunda dimensión, por incremento fueron 4 y 16, respectivamente.

3.6. MODELIZACION DE LAS SÍNTESIS DE OLIGOSACÁRIDOS DERIVADOS DE LA LACTULOSA OBTENIDOS POR TRANSGALACTOSILACIÓN

Utilizando los datos experimentales obtenidos en el estudio de la formación de oligosacáridos derivados de la lactulosa con las β -galactosidasas de *K. lactis* y *A. aculeatus*, bajo diferentes condiciones de reacción (Apartados 3.3.1.1 y 3.3.1.2, respectivamente) se ha desarrollado un modelo cinético que permite explicar la cinética de formación de oligosacáridos derivados de la lactulosa.

Con objeto de obtener un modelo mecanístico adecuado, debe realizarse un ciclo completo de identificación del sistema (Ljung, 1999). Éste incluye la recogida de los datos experimentales, la elección de la estructura del modelo, la definición de un criterio de calidad (función de coste), la optimización de los parámetros con respecto al criterio de ajuste fijado, la evaluación de la

incertidumbre de los parámetros estimados y la validación de los resultados cuestionando cada uno de los pasos en caso de que se demuestre que el modelo no es adecuado.

3.6.1. Elección del modelo

La elección del modelo se ha hecho en base a la literatura existente sobre la hidrólisis y transgalactosilación de la lactosa. Puesto que esta etapa es una de las más críticas a la hora de llevar a cabo el ajuste con los datos experimentales, la discriminación entre los posibles modelos se ha realizado teniendo en cuenta la bondad del ajuste obtenido, la relevancia de la mecánica de reacción propuesta y la calidad de los parámetros estimados en términos de sus intervalos de confianza, siendo el modelo más adecuado aquel que permite mantener un compromiso entre todos estos puntos.

Asimismo, se ha tenido en cuenta para la elección del modelo el principio de parsimonia o *Navaja de Ockham* que establece que “las cosas no deben ser multiplicadas sin necesidad”. La idea es que al añadir parámetros a un modelo se obtiene una mejora en el ajuste de los datos experimentales pero al mismo tiempo los parámetros estimados son “peores” ya que tenemos menos información por parámetro (Posada y Buckley, 2004). Por este motivo, un procedimiento adecuado para la discriminación entre modelos debe incluir un término de penalización por el aumento en el número de parámetros (van Boekel, 2008).

Con objeto de seleccionar el modelo más adecuado entre modelos jerárquicos o anidados (uno de ellos es un caso especial del otro) se ha empleado el criterio de información de Akaike (Akaike, 1974) que permite establecer un ranking entre modelos siendo el más adecuado aquél que posea un menor valor para el criterio.

3.6.2. Definición de un criterio de calidad (Función de coste)

Una vez que la caracterización del modelo se ha llevado a cabo, el problema de identificación se formula como la optimización de una función de coste escalar $J(p)$ con respecto a los parámetros del modelo p . La función de coste es normalmente una cierta medida de la distancia ponderada entre los valores experimentales correspondientes a las variables medidas, representada por el vector \tilde{y} , y los valores previstos para esas variables, representada por el vector y . Por supuesto, el valor óptimo de p dependerá de la función de coste elegida.

En este trabajo hemos considerado una de las funciones de coste más utilizadas, el criterio de mínimos cuadrados ponderados (Walter y Pronzato, 1997):

$$J(p) = \sum_{i=1}^{NE} \sum_{j=1}^{NV} \sum_{k=1}^{NM_{ij}} \frac{(\tilde{y}_{ijk} - y_{ijk}(p))^2}{\sigma_{ijk}^2}$$

donde σ_{ijk} corresponde a la desviación estándar de los datos experimentales. De esta manera, los datos con una desviación estándar elevada tendrán un menor impacto en la solución que los que presentan una mayor precisión.

3.6.3. Algoritmo de optimización

En este trabajo, los datos experimentales se han ajustado al modelo propuesto con la herramienta *SSm GO: Scatter Search for Global Optimization in Matlab* (Egea y col., 2007). Esta herramienta está basada en una implementación de Scatter Search (SS) también conocido en castellano como Búsqueda Dispersa, con la aplicación de mecanismos innovadores y nuevas estrategias para resolver el problema de optimización-simulación que se plantea en los procesos químicos. Entre otras características, SSm utiliza un método de mejora consistente en una búsqueda local con el algoritmo adecuado, utilizando una solución cuidadosamente seleccionada como punto de partida.

3.6.4. Análisis de identificabilidad

Para poder garantizar la calidad de los parámetros estimados debe realizarse un análisis de identificabilidad del modelo postulado que tiene como objeto responder a la pregunta: asumiendo que la estructura del modelo es exacta ¿pueden los parámetros desconocidos ser determinados de forma única a partir de los datos disponibles (limitados y con ruido)? (Audoly y col, 2001).

3.6.5. Intervalos de confianza

Después de ajustar los parámetros p a los datos experimentales, es deseable obtener alguna medida de la calidad de los estimadores. En principio, el objetivo es obtener la distribución de probabilidad de los parámetros estimados o una caracterización adecuada de la misma, por ejemplo, mediante el cálculo de diferentes percentiles de la distribución. Sin embargo, en la mayoría de los casos,

esta distribución no se conoce y por lo tanto es necesario obtener una aproximación de la misma.

Un método que se utiliza con frecuencia para describir los intervalos de confianza de los parámetros estimados es el basado en la Matriz de Información de Fisher. Sin embargo, este método presenta desventajas importantes debido a su naturaleza lineal y, por ello, en este trabajo se ha utilizado el método bootstrap que proporciona una aproximación más robusta de los mismos (Joshi y col., 2006).

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico para determinar las diferencias significativas entre los resultados correspondientes al crecimiento de poblaciones bacterianas y al contenido en SCFAs en el estudio del carácter prebiótico *in vitro* de las mezclas obtenidas de oligosacáridos derivados de la lactosa y de la lactulosa, se llevó a cabo mediante el análisis de la varianza (ANOVA) y el test DMS empleando el programa SPSS para Windows versión 12.7. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $P < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. OBTENCIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS DERIVADOS DE LA LACTULOSA

4.1.1. Hidrólisis y transgalactosilación con β -galactosidasas de diferente origen

Se ha estudiado la formación de oligosacáridos derivados de la lactulosa utilizando distintos preparados comerciales con actividad β -galactosidasa de diferente origen: Pectinex Ultra SP-L (*A. aculeatus*) y Lactozym 3000L HP G (*K. lactis*). También se ha utilizado β -galactosidasa de *A. oryzae*.

4.1.1.1. β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*

Los primeros ensayos realizados para la síntesis de OS derivados de la lactulosa se realizaron basándose en estudios sobre hidrólisis de lactosa utilizando este mismo enzima (Chockchasaiwasdee y col., 2004, Kim y col., 2004). Las condiciones elegidas fueron: 250 g/L de lactulosa en tampón fosfato sódico pH 7,5 y 1mM de MgCl_2 , 40°C, 3 U/mL de enzima y 2 horas de reacción.

La figura R1 muestra el perfil cromatográfico obtenido por HPAEC-PAD de los carbohidratos presentes en la mezcla de reacción obtenida por síntesis enzimática a partir de lactulosa con la β -galactosidasa de *K. lactis*. Del perfil mostrado pudieron identificarse los picos 1, 2, 3 y 5 como galactosa, fructosa, β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-Galp (6-galactobiosa) y lactulosa, respectivamente, mediante la utilización de los patrones comerciales correspondientes. La presencia del compuesto β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-Fru μ (alolactulosa) (pico 4) se confirmó mediante la utilización de un patrón obtenido en el laboratorio.

Además de estos compuestos, el perfil cromatográfico mostró la presencia de dos compuestos mayoritarios, los picos 6 y 7, que fueron identificados tentativamente, por tiempos de retención como trisacáridos. Con objeto de confirmar su estructura, se llevó a cabo una purificación por HPLC-RI semipreparativa cogiendo distintas fracciones a la salida del detector, lo cual permitió obtener estos compuestos totalmente puros.

También pudieron observarse otros oligosacáridos (OOS) con tiempos de retención superior.

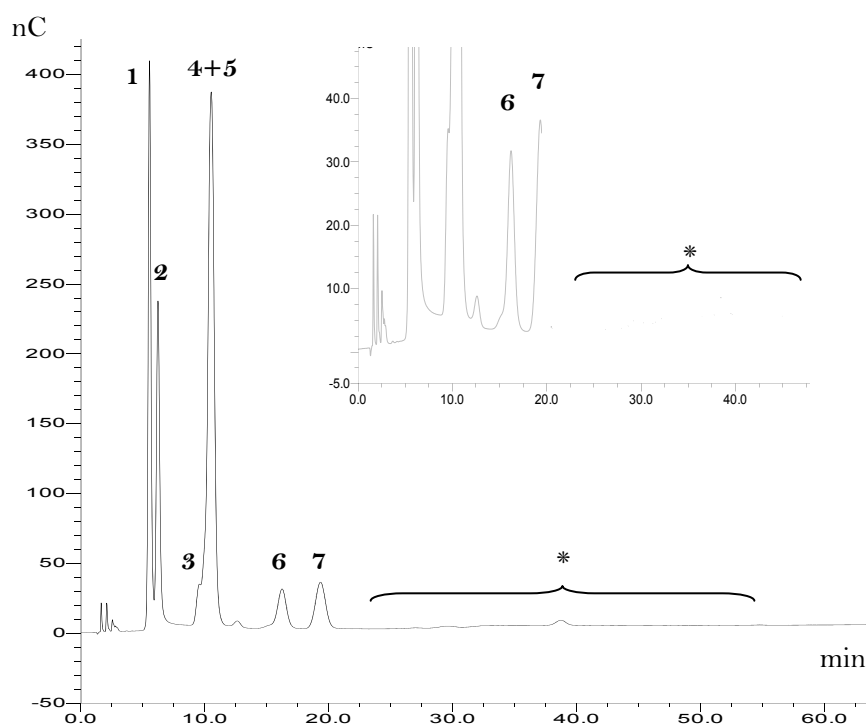


Figura R1.- Perfil cromatográfico obtenido mediante el análisis por HPAEC-PAD (método B) de la mezcla de síntesis obtenida tras la hidrólisis enzimática de lactulosa con la β -galactosidasa de *K. lactis*: 3 U/mL E, 250 g/L de lactulosa, pH 7,5, 40°C y 2 horas de reacción. Picos: 1: Galactosa; 2: Fructosa; 3: β -D-Galp(1 \rightarrow 6)-D-Galp (6-galactobiosa); 4: tentativamente β -D-Galp (1 \rightarrow 6)-D-Frup (alolactulosa); 5: Lactulosa; 6: trisacárido 1; 7: trisacárido 2 * Otros oligosacáridos (OOS).

En la figura R2 se muestra, a modo de ejemplo, el perfil cromatográfico obtenido del análisis por HPLC-RI de una de las mezclas de síntesis obtenidas con la β -galactosidasa de *K. lactis*. El método cromatográfico empleado permitió obtener una alta resolución entre los diferentes componentes de las mezclas, distinguiendo compuestos con un mismo grado de polimerización (1 y 2 mono-; 5 y 4 di-; 6 y 7 trisacáridos). Así, la completa separación de los dos trisacáridos (6 y 7) mediante este método permitió recoger ambos compuestos totalmente puros para confirmar sus estructuras.

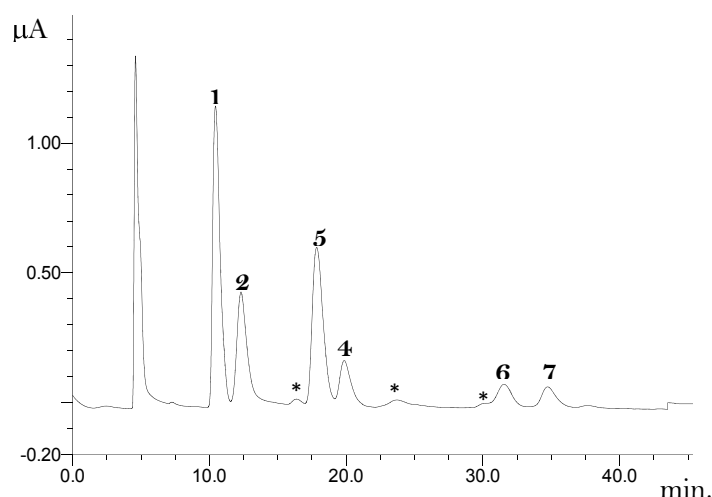


Figura R2.- Perfil cromatográfico obtenido del análisis por HPLC-RI de la mezcla de síntesis obtenida de la hidrólisis enzimática de lactulosa con la β -galactosidasa de *K. lactis*: 3 U/mL de enzima, 250 g/L de lactulosa tras 6 h a pH 6,5 y 50°C.

Picos: **1**: fructosa; **2**: galactosa; **5**: lactulosa; **4**: tentativamente Alolactulosa; **5**: trisacárido 1; **6**: trisacárido 2; *: Otros Oligosacáridos (OOS).

4.1.1.1.1. Caracterización de los oligosacáridos sintetizados

El análisis mediante MS de las fracciones puras de ambos compuestos (picos 6 y 7) demostró que eran trisacáridos, ya que presentaron una masa molecular de 504 uma. Puesto que las propiedades prebióticas de los oligosacáridos dependen, entre otros factores, del número, tipo y secuencia de los monosacáridos que lo conforman y de los enlaces glicosídicos, es muy importante conocer la estructura de los mismos para poseer más información que ayude a entender sus mecanismos de fermentación. Así, para establecer la estructura general y la posición de los enlaces glicosídicos de los trisacáridos formados se llevó a cabo un completo estudio por RMN. La Tabla R1 muestra los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento obtenidos para los principales isómeros de ambos trisacáridos.

Tabla R1.- Desplazamientos químicos (ppm) obtenidos en los espectros de ^1H (500 MHz) y ^{13}C (125 MHz) y constantes de acoplamiento (Hz) de los principales isómeros de los trisacáridos 1 (pico 5) y 2 (pico 6) en D_2O .

Posición	Trisacárido 1 (pico 6)		Trisacárido 2 (pico 7)		Lactulosa	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1a	3,42; d, 11,7	64,05	3,73, d, 11,5	71,62	3,65	64,08
1b	3,58; d, 11,7		3,82, d, 11,5		3,49	
2		98,21		97,77		98,26
3	3,79; d, 9,8	66,36	3,82, d, 9,8	66,45	3,84	66,23
4	3,99; dd, 9,8, 3,2	77,99	4,01, dd, 10,0, 3,4	77,25	4,06	77,59
5	4,06; dt, 3,3, 1,5	66,97	4,07, dt, 3,5, 1,5	66,85	4,13	66,97
6a	3,89, dd, 1,4, 13,0	63,19	3,90, dd 1,4, 12,9		3,94	
6b	3,61, dd,		3,61, superpuesto	63,21	3,68	63,18
1'	4,43, d, 7,8	101,04	4,42, dd, 7,8	100,98	4,48	101,02
2'	3,47, dd, 7,8, 9,9	70,83	3,47, dd, 7,8, 10,0	70,86	3,53	70,95
3'	3,55, dd, 9,8, 3,4	72,66	3,54, dd 10,0, 3,5	72,64	3,61	72,79
4'	3,82, dd, 3,3, nm	68,84	3,78, dd 3,4, 0,9	68,85	3,85	68,88
5'	3,78, ddd, 1,0, 3,8, 8,0	74,39	3,57, ddd, 0,9, 4,6 8,3	75,52	3,64	75,55
6'a	3,80, dd, 3,8, 12,0	69,16			3,73	
6'b	3,92, dd, 7,9, 12,0		3,64-3,60, 2° orden	61,31	3,67	61,34
1''	4,35, d, 7,9	103,44	4,30 d 7,8	103,53		
2''	3,38, dd, 7,9, 9,8	70,99	3,43 dd, 7,8, 10,0	70,91		
3''	3,52, dd, 9,8, 3,2	72,77	3,51 dd 9,9, 3,4	72,76		
4''	3,79, dd, 3,2, nm	68,77	3,78 dd 3,4, 0,9	68,77		
5''	3,56, ddd, 0,8, 4,4, 8,0	75,28	3,58 ddd 0,9,4,5,8,9	75,41		
6''a/b	3,64-3,60, 2° orden	61,15	3,64-3,60 2° orden	61,15		

*Los desplazamientos químicos señalados en color se corresponden con los carbonos anoméricos (en verde), cuaternarios (en lila) y protones anoméricos (en rojo) de cada uno de los compuestos identificados.

El espectro de ^{13}C del trisacárido **1** en D_2O dió lugar a tres conjuntos de señales indicando una mezcla de los isómeros mostrados en la Figura R3 (**1A**, **1B** y **1C**) debido al equilibrio mutarrotacional de la lactulosa entre sus formas piranosa y furanosa (Mayer y col., 2004).

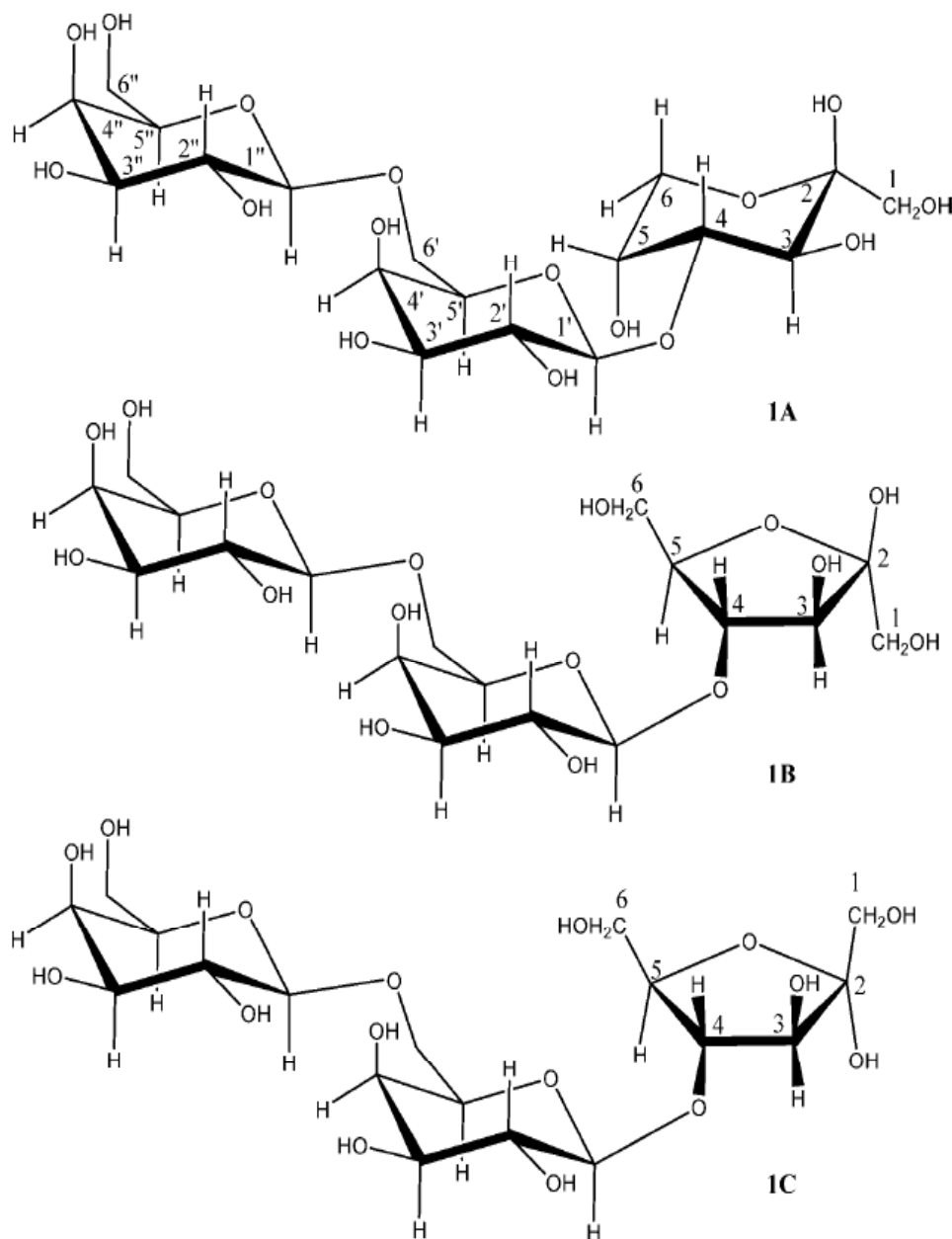


Figura R3.- Estructuras de los isómeros del trisacárido **1**

- (**1A**) β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-fructopiranososa
 (**1B**) β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-fructofuranosa
 (**1C**) β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -D-fructofuranosa.

Asumiendo que las diferencias en la relajación de los carbonos anoméricos pueden ser despreciables para los tres isómeros, se determinó que la proporción de los tres isómeros era aproximadamente 75: 20: 5. El conjunto de resonancias más intenso correspondió al isómero más abundante (1A), con dos carbonos anoméricos a δ 103,44 y 101,04 y un carbono cuaternario a δ 98,21. Paralelamente, el espectro de RMN de ^1H mostró señales para los dos protones anoméricos a δ 4,43 y 4,35.

La completa elucidación de las estructuras se llevó a cabo no sólo mediante estudios unidimensionales (1D): ^1H , ^{13}C , TOCSY, sino también bidimensionales (2D): gCOSY, TOCSY, ROESY, gHSQC, y gHMBC. Así, del espectro en dos dimensiones [^1H , ^1H] TOCSY, se identificaron dos sistemas de siete espines. Además, se encontraron dos sistemas adicionales de espín atribuibles a la unidad de fructosa. La asignación de los sistemas de espín individuales se llevó a cabo mediante los experimentos unidimensionales de RMN 1D-TOCSY y 1D-COSY. La excitación selectiva de los protones anoméricos a δ 4,43 y 4,35 mostraron resonancias a δ 3,47 (H-2), 3,55 (H-3), 3,82 (H-4), y 3,78 (H-5) para el primero y a δ 3,38 (H-2), 3,52 (H-3), y 3,79 (H-4) para el último (Figura R4).

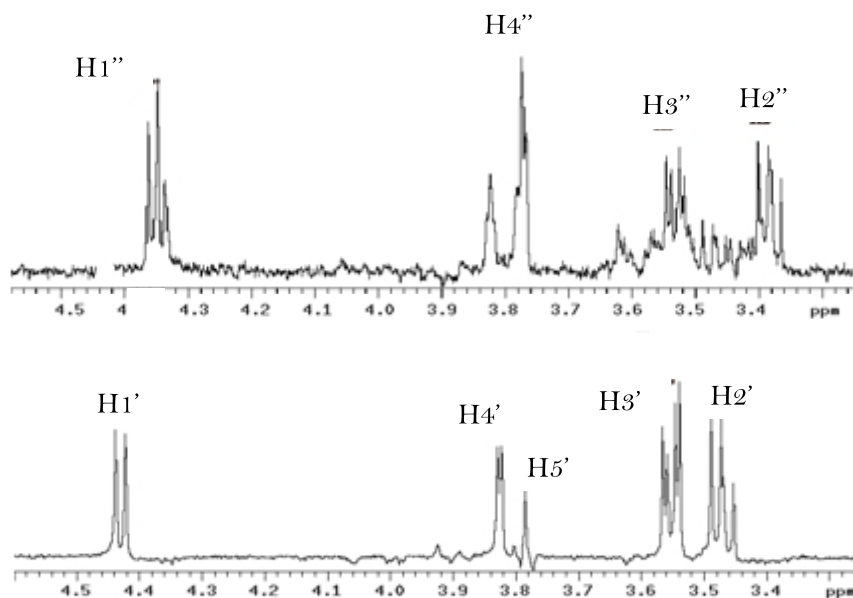


Figure R4.- Espectro 1D-TOCSY del trisacárido **1** en D_2O . (A) Excitación selectiva del protón anomérico a 4,43 ppm. (B) a 4,35 ppm.

De los valores de las constantes de acoplamiento (Tabla R1), se confirmó la existencia de dos unidades de β -galactosa. La posición de los enlaces glicosídicos se estableció mediante los espectros de gHMBC y ROESY. Además las correlaciones por HMBC entre H-1' a δ 4,43 y C-4 a δ 77,99 (fructosa) y entre C-

1' a δ 101,04 y H-4 (fructosa) a δ 3,99 permitieron establecer, sin ninguna duda, el enlace 1 \rightarrow 4 entre una unidad de galactosa y la de fructosa. Por otro lado, las correlaciones por HMBC entre H-1'' a δ 4,35 y C-6' a δ 69,16 y entre C-1' a δ 103,44 y H-6'a y H-6'b a δ 3,80 y 3,92, respectivamente, permitieron establecer el enlace 1 \rightarrow 6 entre las dos unidades galactosa. La correlación para los carbonos anoméricos se muestra en la Figura R5.

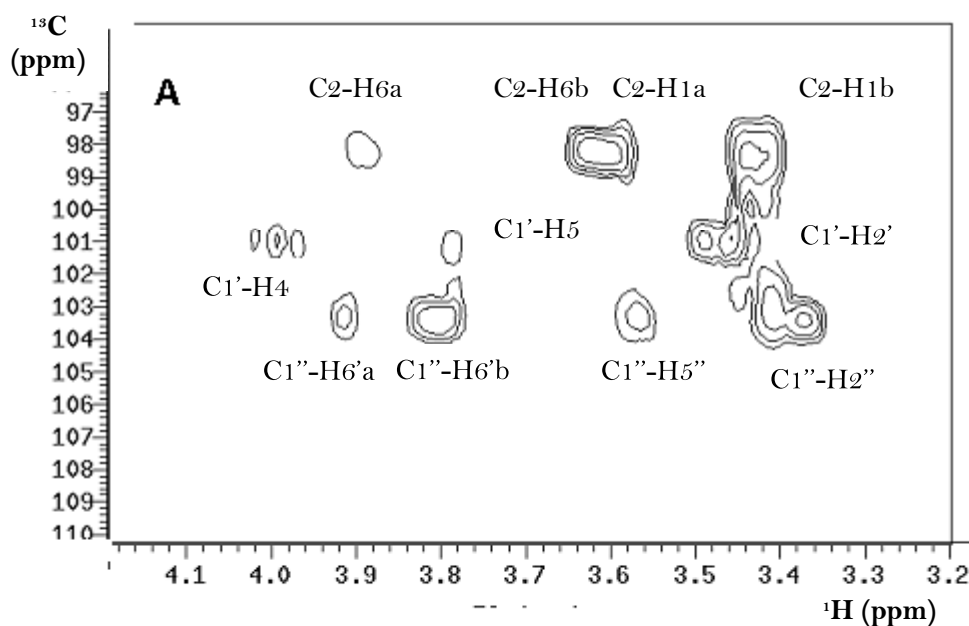


Figura R5.- Espectro parcial de gHMBC para el trisacárido 1 con las correlaciones observadas para los carbonos anoméricos (C2).

Esta estructura obtenida de los espectros de correlación fue corroborada por ROESY (Figura R6). El bajo campo observado para el C-6' en el espectro permitió confirmar la estructura propuesta.

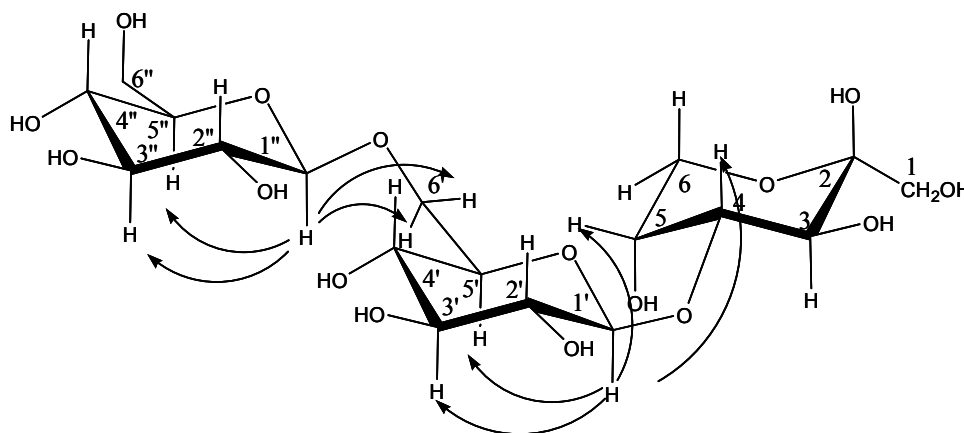


Figura R6.- Correlaciones ROESY intra-residuales (flechas continuas) e inter-residuales (flechas discontinuas) para los principales isómeros del trisacárido 1 en D₂O.

Finalmente, se establecieron el tamaño del anillo y las configuraciones anoméricas de la unidad fructosa. De la comparación entre los desplazamientos químicos de la unidad fructosa y de los propuestos para los isómeros de la lactulosa (Mayer y col., 2004) se determinó que el isómero mayoritario para el trisacárido 1 fue el β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-fructopiranososa (**1A**). Fue también posible medir la resonancias para los isómeros minoritarios: C-2 [(**1B**, δ 102,42) y (**1C**, δ 105,11)] y C-4 [(**1B**, δ 84,31) y (**1C**, δ 85,54)] (resultados no mostrados en la Tabla R1). Los valores encontrados para δ C-4 del **1B** y **1C** fueron típicos de los furanósidos (Kalinowski y col., 1988). De la comparación de estos valores se estableció que el segundo isómero más abundante fue el β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-fructofuranosa (**1B**) y el tercero el β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -D-fructofuranosa (**1C**).

Por lo que se refiere al trisacárido 2, el espectro de RMN de ^{13}C (Figura R7) en D_2O dio lugar a tres conjuntos de señales, siendo la proporción de los tres isómeros (2A, 2B y 2C) aproximadamente 80:15:5.

El conjunto más importante de resonancias, se correspondieron con 2A, con dos carbonos anoméricos a δ 103,53 y 100,98 y un carbono cuaternario a δ 97,77. Paralelamente, el espectro de ^1H mostró dos señales para los protones anoméricos a δ 4,42 y 4,30 (Tabla R1).

Utilizando el mismo procedimiento que para el anterior trisacárido, se confirmó la existencia de una unidad de fructosa y de dos de β -galactosa. Las correlaciones obtenidas por HMBC entre H-1' a δ 4,42 y C-4 (fructosa) a δ 77,25 y entre C-1' a δ 100,98 y H-4 (fructosa) a δ 4,01 confirmaron el enlace 1 \rightarrow 4 entre una unidad de galactosa y la de fructosa en la mitad lactulosa. Además las correlaciones obtenidas por HMBC entre H-1'' a δ 4,30 y C-1 a δ 71,62 y entre C-1'' a δ 103,53 y H-1a y H-1b a δ 3,73 y 3,82, respectivamente, permitieron establecer el enlace 1 \rightarrow 1 entre la fructosa y la segunda unidad de galactosa (Figura R8).

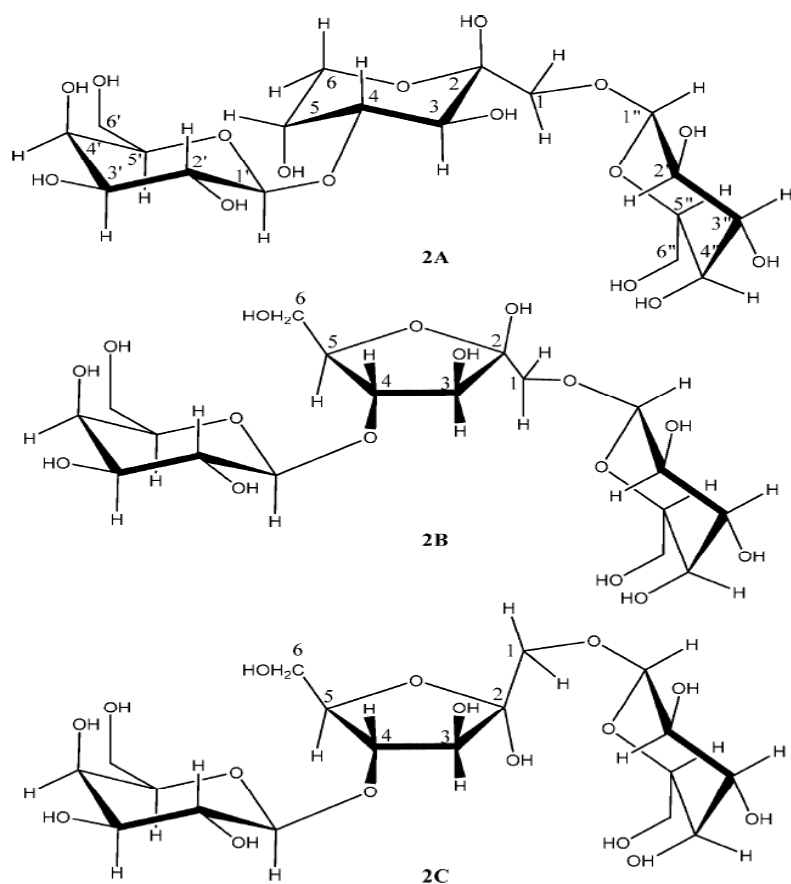


Figura R7.- Estructuras para los principales isómeros del trisacárido **2**.

- (**2A**) β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-fructopiranosil-(1 \rightarrow 1)- β -D-galactopiranososa
 (**2B**) β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-fructofuranosil-(1 \rightarrow 1)- β -D-galactopiranososa
 (**2C**) β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -D-fructofuranosil-(1 \rightarrow 1)- β -D-galactopiranososa

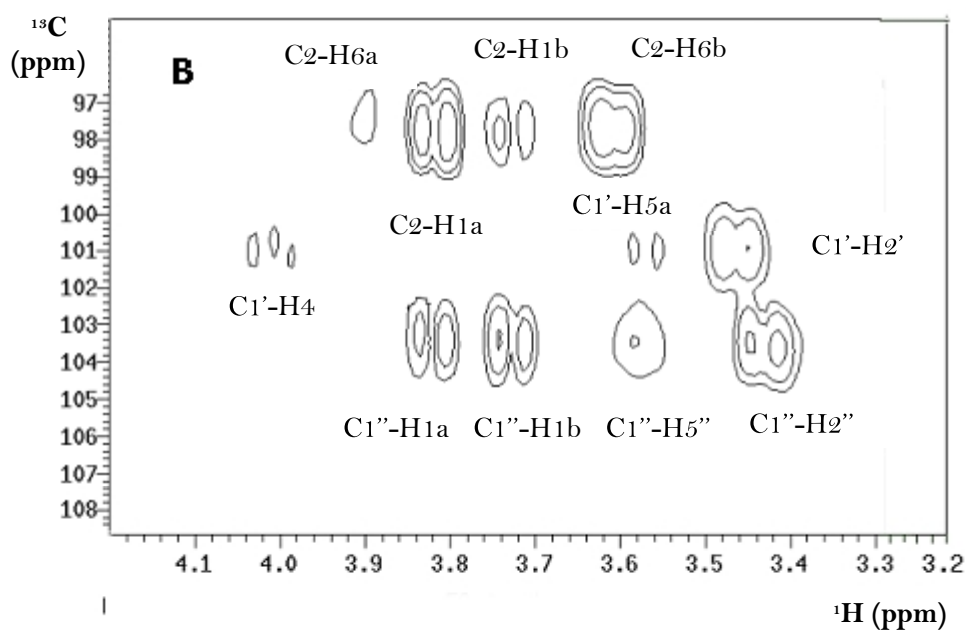


Figura R8.- Espectro parcial de gHMBC para el trisacárido **2** con las correlaciones para los carbonos anoméricos.

Este resultado fue apoyado por el espectro ROESY (Figura R9) y el bajo campo observado para el C-1.

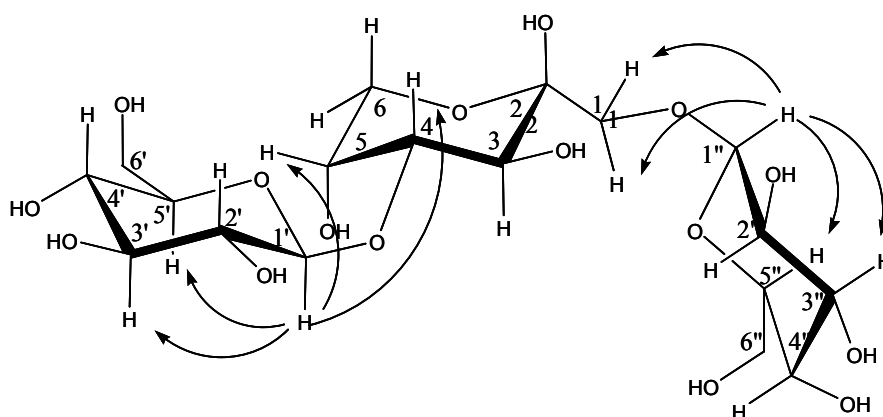


Figura R9.- Correlaciones ROESY intra-residuales (flechas continuas) e inter-residuales (flechas discontinuas) para los principales isómeros del trisacárido **2** en D₂O.

De la misma manera que se mostró para el trisacárido **1**, se determinó que el isómero mayoritario para el trisacárido **2**, que fue el β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-fructopiranosil-(1 \rightarrow 1)- β -D-galactopiranososa (**2A**). También se midieron las resonancias para los isómeros minoritarios (resultados no mostrados en la Tabla R1): C-2 [(**2B**, δ 102,97) y (**2C**, δ 104,98)] y C-4 [(**2B**, δ 84,08) y (**2C**, δ 86,20)]. De la comparación de esos valores, se estableció como el segundo isómero en abundancia el β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-fructofuranosil-(1 \rightarrow 1)- β -D-galactopiranososa (**2B**) y el tercero como el β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -D-fructofuranosil-(1 \rightarrow 1)- β -D-galactopiranososa (**2C**).

En resumen, se puede decir que la β -galactosidasa de *K. lactis* origina, durante la hidrólisis de la lactulosa, dos trisacáridos mayoritarios, la β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-fructopiranososa (6'-galactosil-lactulosa) y la β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-fructopiranosil-(1 \rightarrow 1)- β -D-galactopiranososa (1-galactosil-lactulosa).

Los resultados encontrados para la 6'-galactosil-lactulosa, que muestran un enlace β (1 \rightarrow 6) entre galactosas ya se encontraron previamente en el galactooligosacárido 6'-galactosil-lactosa producido mayoritariamente por la misma enzima utilizando lactosa como sustrato. Sin embargo el enlace β (1 \rightarrow 1) encontrado en la 1-galactosil-lactulosa, no se había descrito antes en la literatura. Varios trabajos han demostrado que tanto los pesos moleculares de los

carbohidratos como los enlaces glicosídicos contribuyen a la selectividad de la fermentaciones por parte de las bacterias presentes en el tracto gastrointestinal. Se ha demostrado que las bifidobacterias son más selectivas hacia los enlaces $\beta(1\rightarrow6)$ (Rowland y Tanaka, 1993) mientras que no hay información sobre los enlaces $\beta(1\rightarrow1)$. Además, en general, los carbohidratos con un DP de 3 son fermentados selectivamente por las bifidobacterias (Kaneko y col., 1994; Kaplan y Hutkins, 2000). En base a esto, 6'-galactosil-lactulosa y la 1-galactosil-lactulosa podrían ser buenos candidatos para ser considerados como nuevos prebióticos. Estos trisacáridos derivados de la lactulosa podrían exhibir una mayor persistencia colónica que la lactulosa, debido a su mayor peso molecular, alcanzando las zonas más distales donde se originan la mayor parte de los desórdenes intestinales.

Estos resultados demuestran que la lactulosa puede ser utilizada como sustrato para la síntesis de oligosacáridos con las β -galactosidasas de *K. lactis* dando lugar a trisacáridos con enlaces $\beta(1\rightarrow6)$ y $\beta(1\rightarrow1)$.

Una vez identificados y caracterizados los oligosacáridos mayoritarios originados a partir de la hidrólisis y transgalactosilación de la lactulosa, se procedió a optimizar las condiciones de síntesis estudiando la influencia de distintos parámetros tales como, temperatura, pH, tiempo, concentración de sustrato y concentración de enzima, en su formación.

4.1.1.1.2. Estudio de las condiciones óptimas de síntesis

Efecto de la temperatura

Para estudiar el efecto de la temperatura en la síntesis de los OS derivados de la lactulosa mediante la β -galactosidasa de *K. lactis*, se ensayaron dos temperaturas, 40 y 50°C a una concentración de lactulosa de 250 g/L, y un pH de 6,5. Como puede verse en la figura R10a, la mayor liberación de galactosa a 50°C indica un mayor grado de hidrólisis con respecto a 40°C, lo cual coincide con una mayor hidrólisis de lactulosa a esa temperatura (figura R10c). En cuanto a la formación de disacáridos, la figura R10d muestra como a 50°C se alcanza antes la máxima formación (10,53%) para luego disminuir progresivamente debido a la hidrólisis. Sin embargo, a 40°C la velocidad es mucho menor alcanzándose valores de 11,96% a las 24 h de reacción.

Del mismo modo, la formación de la 6'-galactosil-lactulosa (figura R10e) es mayor a 50°C que a 40°C a tiempos cortos de reacción. Por otro lado, el mayor rendimiento del trisacárido 1-galactosil-lactulosa (Figura R10f) se obtiene a 40°C, ya que a 50°C la velocidad de formación es mayor pero también lo es la de hidrólisis, degradándose rápidamente el compuesto cuando se alcanzan rendimientos de 7,46%. En la formación de otros oligosacáridos (OOS) presentes en la mezcla de reacción (Figura R10g) no se observa el mismo comportamiento que en el caso de los trisacáridos, ya que no se observa degradación, probablemente debido, a que en este grupo de compuestos se están incluyendo tanto di- como trisacáridos. La gráfica correspondiente a la formación de los oligosacáridos totales (OSt) (Figura R10h) muestra como a 50°C y 6 h de reacción se alcanza el mismo rendimiento (> 25%) que a 40°C y 24 h de reacción, indicando, por lo tanto que 50°C sería la temperatura más adecuada para la formación de oligosacáridos derivados de la lactulosa y la enzima β -galactosidasa de *K. lactis*.

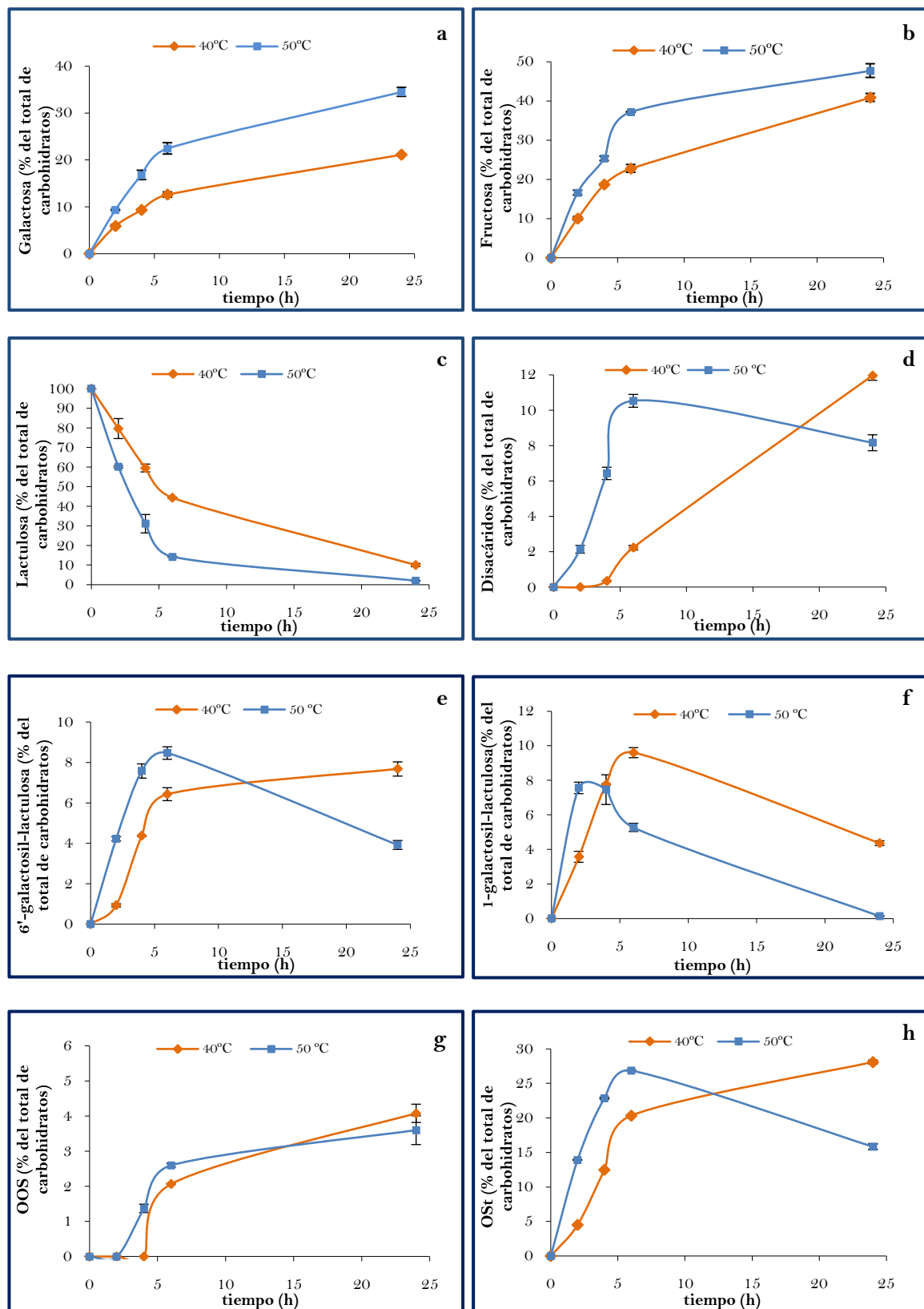


Figura R10.- Efecto de la temperatura en la producción de OS durante la hidrólisis enzimática de la lactulosa (250 g/L) con la β -galactosidasa de *K. lactis* (3 U/mL) a pH 6,5. OOS: otros oligosacáridos presentes en la mezcla de reacción. OSt: oligosacáridos totales.

Efecto de la concentración de lactulosa

Uno de los factores más influyentes en el rendimiento de la transglicosilación es la concentración de sustrato, y un aumento puede cambiar la reacción hacia la transglicosilación (Maugard y col., 2003; Hsu y col., 2007). Por ello, se ha estudiado la formación de OS utilizando distintas concentraciones de lactulosa, 250, 450 y 650 g/L, con objeto de elegir, para todos los estudios posteriores, aquella en la que se produzca un mayor rendimiento.

En la figura R11 se muestra la evolución de la lactulosa durante el tiempo de hidrólisis así como la galactosa y fructosa liberadas y la formación y evolución de los oligosacáridos formados. A 250 g/L la reacción, como era de esperar es mucho más rápida que utilizando 450 y 650 g/L. Así, con 250 g/L de lactulosa, el porcentaje de monosacáridos (Figuras R11a y R11b) presentes en la mezcla de reacción fue mucho mayor que con concentraciones superiores de sustrato (450 y 650 g/L). Del mismo modo, el porcentaje de lactulosa remanente (Figura R11c) fue menor a la concentración más baja ensayada.

En lo que se refiere a la formación de disacáridos (Figura R11d), con 250 g/L de lactulosa alcanza su nivel máximo a las 8 h obteniendo un 13% (p/p), mientras que con 450 y 650 g/L este mismo rendimiento se alcanza tras 24 h. Este comportamiento parece indicar que, con 250 g/L hay un mayor grado de hidrólisis que con 450 g/L y 650 g/L y que parte de los disacáridos formados a las 8 h con 250 g/L provienen de la hidrólisis de los trisacáridos formados. Así, en las figuras R11e y R11f se observa como el rendimiento de los trisacáridos empieza a disminuir antes de las 8h.

La 6'-galactosil-lactulosa, además, parece ser más estable a la hidrólisis que el trisacárido 1-galactosil-lactulosa (Figura R11f), cuyo rendimiento empieza a disminuir a partir de las 2 h. También puede observarse como los OOS se formaron en mayor proporción a la menor concentración ensayada de la lactulosa obteniendo el máximo a las 6 h de reacción.

El rendimiento de los OS totales fue cercano al 30% a la menor concentración de lactulosa ensayada.

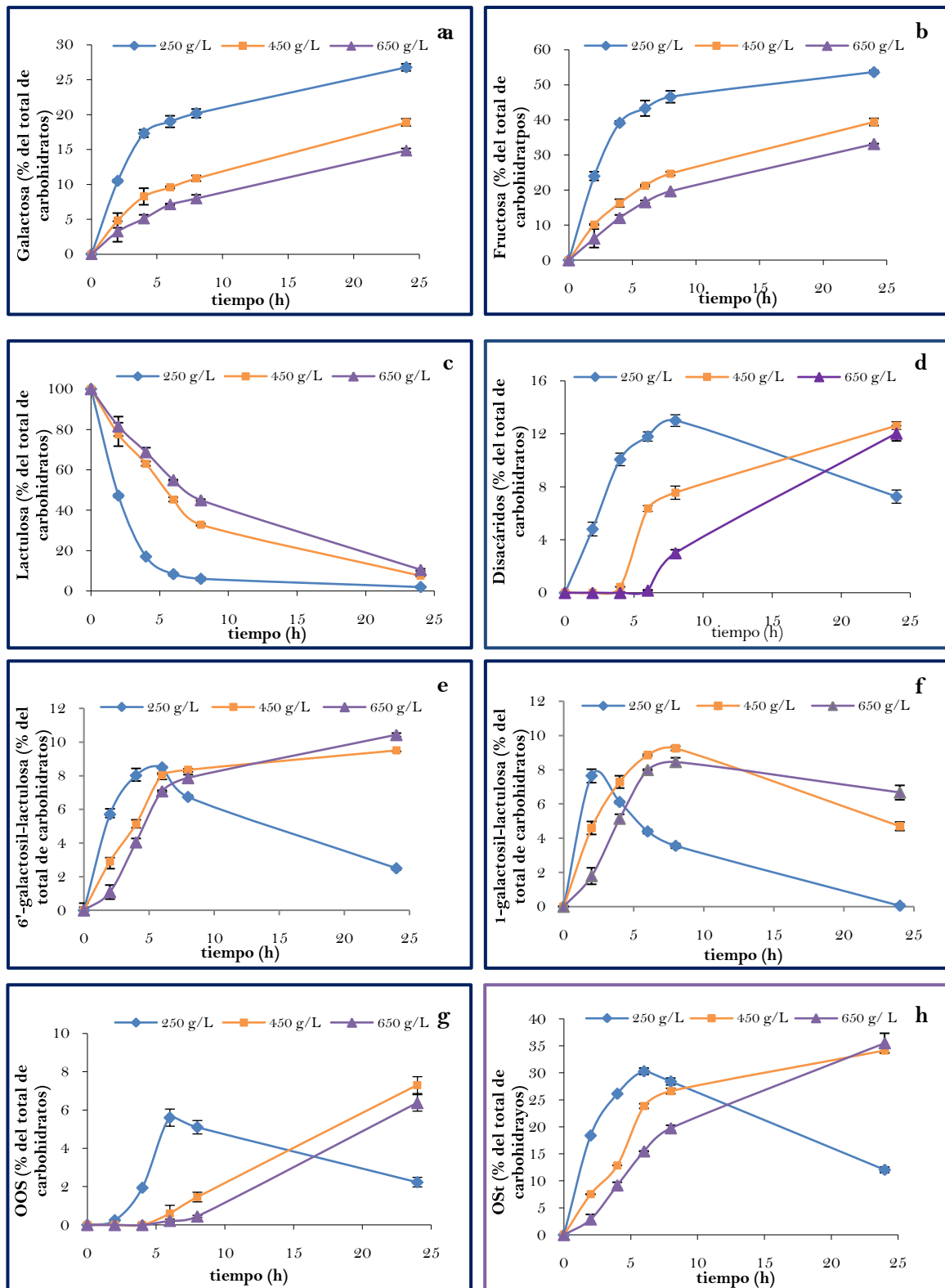


Figura R11.- Efecto de la concentración de sustrato en la producción de OS durante la hidrólisis enzimática de la lactulosa con la β -galactosidasa de *K. lactis* (3 U/mL) a pH 6,5 y 50°C. OOS: otros oligosacáridos presentes en la mezcla de reacción. OST: oligosacáridos totales.

Efecto del pH

Es conocido que el efecto del pH en la producción de OS puede variar según el origen de la β -galactosidasa (Hsu y col., 2007). En algunos casos el pH puede afectar en gran medida de la síntesis de OS de tal forma que en algunos casos se ha comprobado que puede prevalecer la transglicosilación sobre la hidrólisis (Ji y col., 2005) mientras que en otros apenas se nota su influencia (Iwasaki y col., 1996; Shin y Yang, 1998).

El estudio de la influencia del pH en la formación de OS derivados de la lactulosa, se llevó a cabo utilizando disoluciones de lactulosa (250 g/L) a 50°C a dos valores de pH, 6,5 y 7,5. A valores de pH inferiores y superiores, la enzima se encuentra fuera de su intervalo óptimo de actuación. En la figura R12 se observa una mayor velocidad a pH 6,5 que a pH 7,5. Así, el porcentaje de fructosa (Figura 12b) presente en el medio de reacción fue mayor a pH 6,5, y el porcentaje de lactulosa remanente (Figura R12c) menor.

Por otro lado, los resultados obtenidos para la galactosa (Figura R12a) indican una mayor participación de la misma a ese valor de pH. En la formación de los disacáridos (figura R12d) y de los dos trisacáridos mayoritarios (Figuras R12e y R12f) apenas existen diferencias entre ambos pH. Sin embargo, estas diferencias son más acusadas para la formación de OOS (Figura R12g), ya que la reacción tiene lugar más lentamente a pH 7,5. A pH 6,5 la formación es máxima a las 5 h, sin embargo, los compuestos originados comienzan a degradarse inmediatamente. Como puede observarse en la Figura R12h, el pH óptimo de formación de los OS_t es de 6,5, aproximadamente un 5% mayor que a pH 6,5 a las 6 horas de reacción.

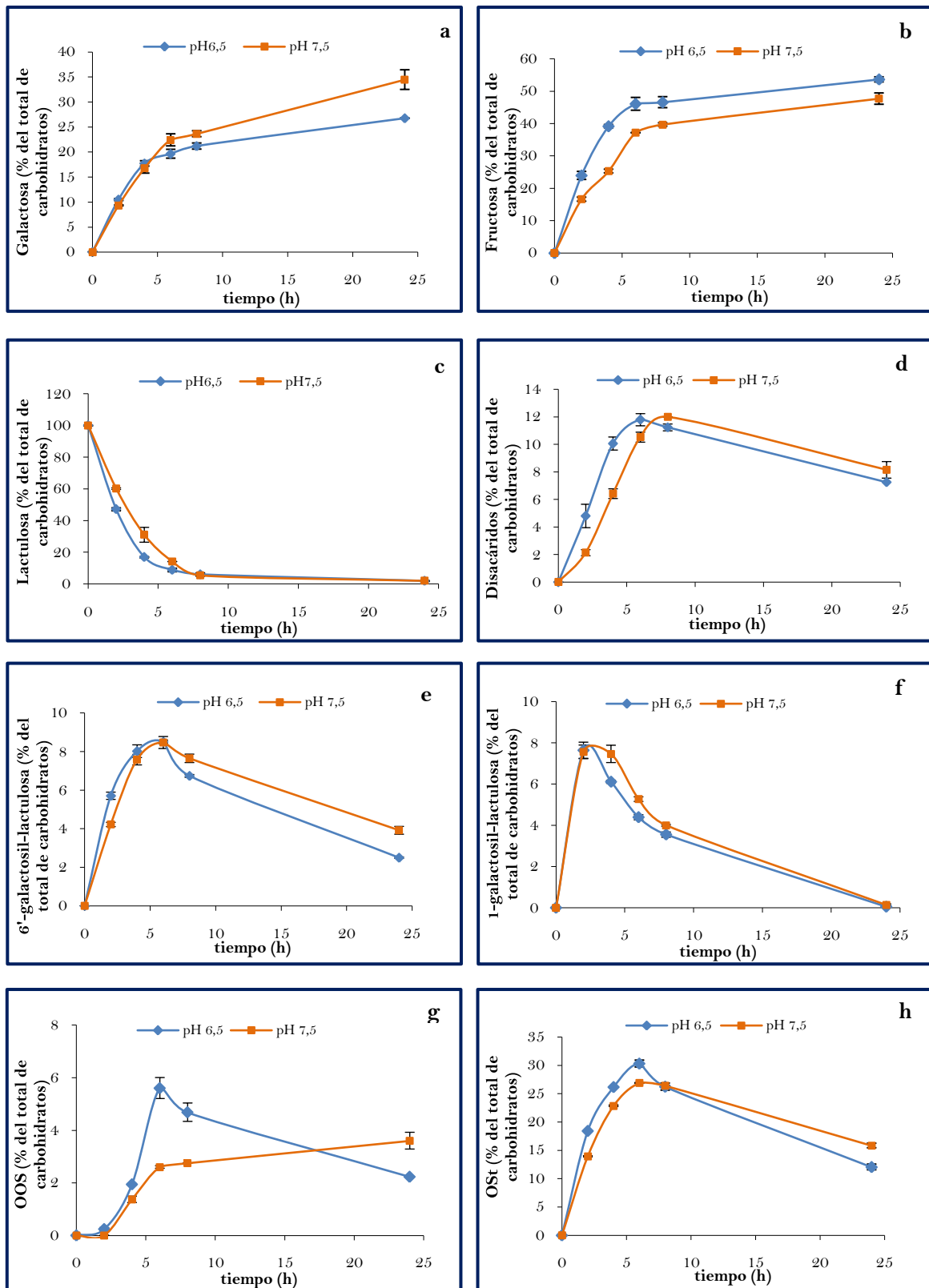


Figura R12.- Efecto del pH en la producción de OS durante la hidrólisis enzimática de la lactulosa (250g/L) con la β -galactosidasa de *K.lactis* (3 U/mL) a 50°C. OOS: otros oligosacáridos presentes en la mezcla de reacción. OSt: oligosacáridos totales.

Efecto de la concentración de enzima

Por último, para estudiar el efecto de la concentración de enzima en los OS obtenidos a partir de la hidrólisis de la lactulosa con la β -galactosidasa de *K. lactis*, se realizaron ensayos con 250 g/L de lactulosa, a pH 6,5 y 50°C utilizando concentraciones de enzima de 3, 6 y 9 U/mL (Figura R13). El mayor contenido en monosacáridos (Figuras R13a y b) junto con el menor porcentaje de lactulosa remanente (Figura R13c) indica, lógicamente, que con 9 U/mL, la hidrólisis es mayor que con 3 y 6 U/mL. En la formación de los disacáridos (Figura R13d) apenas existieron diferencias entre las concentraciones de 3 y 6 U/mL, pero sí con 9 U/mL, concentración a la cual se obtuvo el mayor rendimiento (13%) tras 2 horas de reacción.

A partir de este tiempo, y a diferencia de las otras concentraciones de enzima empleadas, el porcentaje de estos compuestos disminuyó considerablemente mostrando que la velocidad de reacción es mucho mayor cuanto mayor es la concentración de enzima empleada. En cuanto a la formación de los trisacáridos (Figuras R13e y R13f), la concentración de 6 U/mL fue con la que se obtuvo un mejor rendimiento. Así, con 6 U/mL se alcanzó un 10,39 % para la 6'-galactosil-lactulosa y un 11,46 % para la 1-galactosil-lactulosa a las 2 h de reacción. Con 9 U/mL los máximos rendimientos también se alcanzaron tras 2 h de reacción (9,38% de 6'-galactosil-lactulosa y 8,94 % de 1-galactosil-lactulosa a las 2 h y 1 h de reacción, respectivamente), sin embargo no se alcanzaron rendimientos tan altos como con 6 U/mL, debido a la alta velocidad de reacción, que hizo que los productos se hidrolizaran rápidamente tras ser formados. Así, estos resultados indican que el compuesto 1-galactosil-lactulosa se forma más rápidamente que la 6'-galactosil-lactulosa, hidrolizándose también a mayor velocidad. El resto de oligosacáridos formados (Figura R13g) alcanzan, sin embargo, el máximo rendimiento (10%) con 6 U/mL tras 6 h de reacción, disminuyendo drásticamente, pasado este tiempo. Con 9 U/mL el rendimiento alcanzado es mucho menor (3%) indicando que, debido a la gran cantidad de enzima presente en el medio, estos compuestos se hidrolizan muy rápidamente.

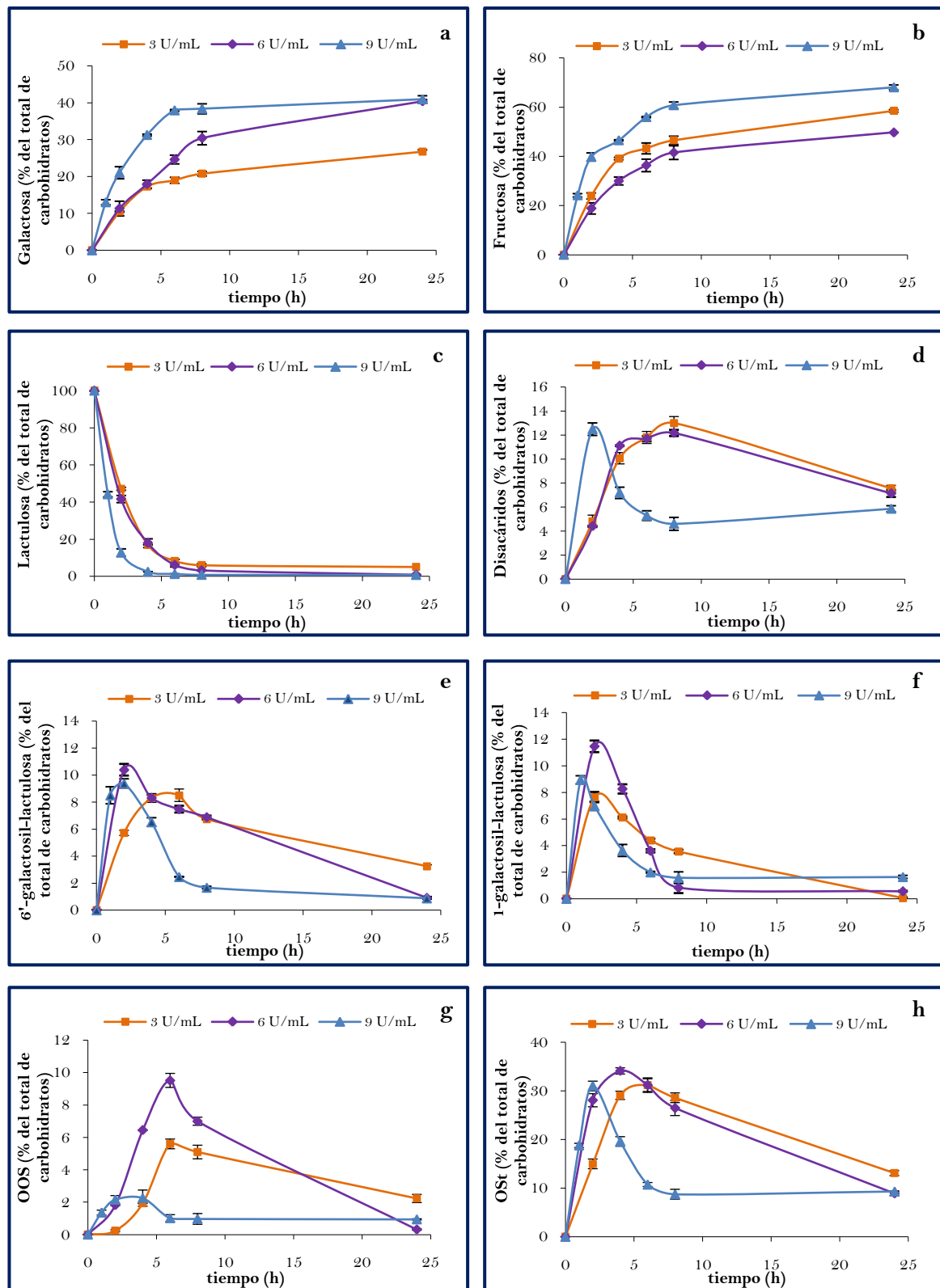


Figura R13.- Efecto de la concentración de enzima en la producción de OS durante la hidrólisis enzimática de la lactulosa con la β -galactosidasa de *K. lactis*, 250g/L de lactulosa, a pH 6,5 y 50°C. OOS: otros oligosacáridos presentes en la mezcla de reacción. OST: oligosacáridos totales.

El estudio de la formación de nuevos OS con la β -galactosidasa de *K. lactis* a partir de lactulosa ha mostrado que se forman dos nuevos trisacáridos, (la 6'-galactosil-lactulosa y otro de igual masa pero con una estructura muy diferente, la 1-galactosil-lactulosa. Las mejores condiciones de reacción para la formación de los trisacáridos totales fueron 250 g/L de lactulosa, 6 U/mL de enzima, pH 6,5, 50°C y 2 horas de reacción. La mezcla de reacción, bajo estas condiciones está compuesta por: 30,25% de monosacáridos, 41,65 % de lactulosa, 10,39 % de 6'-galactosil-lactulosa, 11,46% de 1-galactosil-lactulosa, 4,41% de disacáridos y 1,82% de OOS no identificados entre los que probablemente se encuentren tanto di- como trisacáridos.

Efecto inhibitorio de los productos de reacción

Como es bien sabido, durante la reacción de transgalactosilación, los productos pueden ejercer un efecto inhibitorio en el progreso de la reacción (Chockchaisawasdee y col., 2005). Por ello, y para completar el estudio sobre la influencia de diferentes parámetros en la síntesis de OS derivados de la lactulosa mediante la utilización de β -galactosidasa de *K. lactis*, se han llevado a cabo varios ensayos utilizando distintas concentraciones de galactosa y de fructosa en la formación de los trisacáridos 6'-galactosil-lactulosa y 1-galactosil-lactulosa. En las Figuras R14a y R14d puede observarse la evolución de la concentración de lactulosa con el tiempo, observándose que cuando se añaden galactosa o fructosa al medio de reacción la concentración de lactulosa remanente es mayor. De manera general y, a la vista de los resultados mostrados en la figura, la adición de fructosa (Figura R14 e y f) provoca una mayor inhibición que la galactosa (Figura R14 b y c) para la reacción de transgalactosilación a igual concentración añadida. Este fenómeno puede deberse a que la unión monosacárido-enzima imposibilita la unión del sustrato al sitio activo evitando así el avance de la reacción de transgalactosilación. Esto provoca que exista una mayor cantidad de lactulosa presente en el medio y una menor cantidad de trisacáridos.

En estudios de inhibición llevados a cabo con el mismo tipo de enzima pero empleando lactosa como sustrato, Cavaille y Combes, (1995), Kim y col., (2004) y Chockchaisawasdee y col., (2004), encontraron que la galactosa actuaba como inhibidor competitivo cuando la lactosa se encontraba a bajas concentraciones. La glucosa, sin embargo, resultó ser un inhibidor no competitivo. Los resultados obtenidos en la presente memoria ponen de manifiesto que el comportamiento de la enzima frente a la inhibición por monosacáridos en la hidrólisis de la lactulosa es diferente a la observada con la lactosa, presentando en el primer caso una inhibición competitiva por parte de ambos monosacáridos, mientras que en el segundo sólo existe competición por parte de la galactosa.

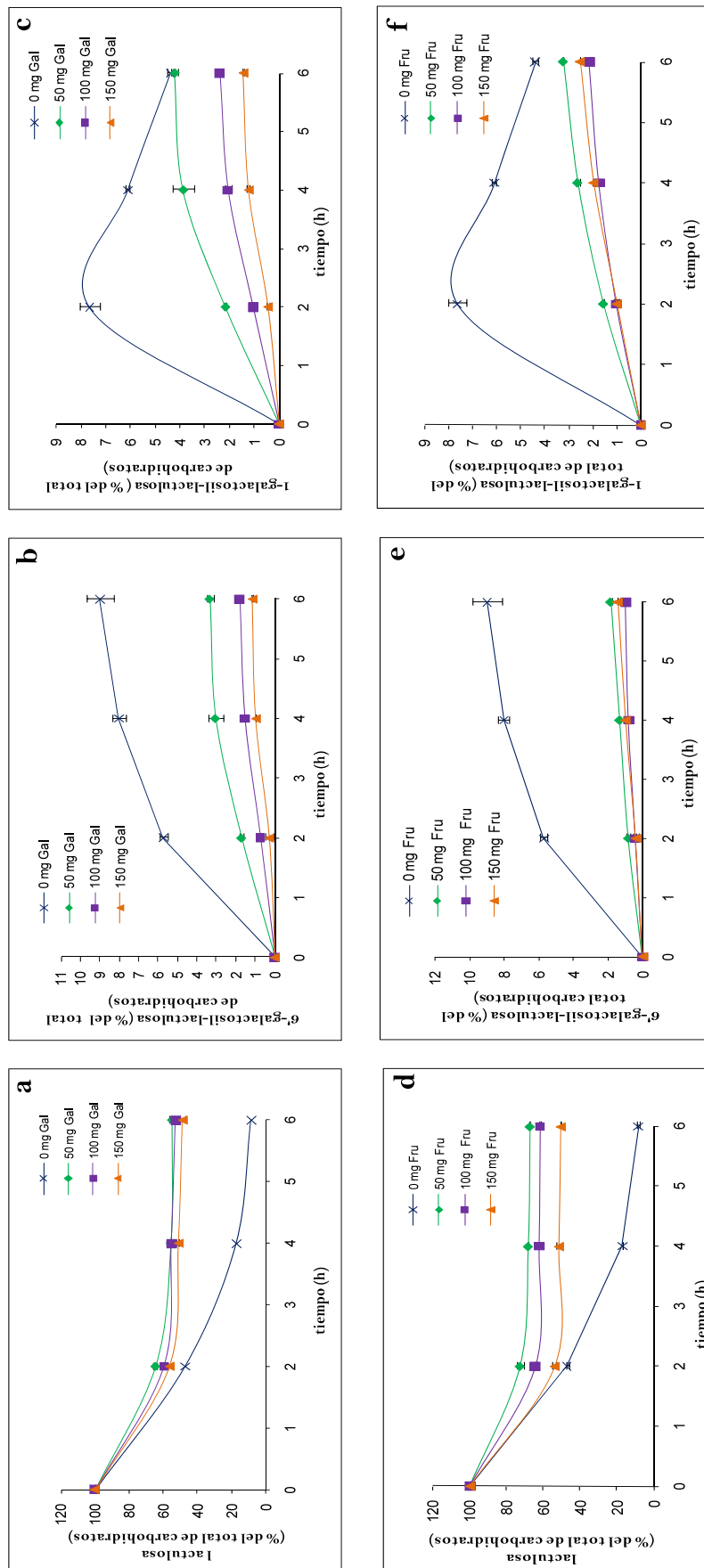


Figura R14.-Efecto de la adición de galactosa (a, b y c) y fructosa (d, e y f) en la producción de 6'-galactosil-lactulosa (b y e) y 1-galactosil-lactulosa (c y f) y en la hidrólisis de lactulosa (a y d), durante la reacción de transgalactosilación utilizando 250 g/L de lactulosa a 40°C en tampón fosfato 0,05 M pH 7,5 y 1mM de $MgCl_2$, 3 U/mL de β -galactosidasa y 6 horas.

4.1.1.2. β -galactosidasa de *Aspergillus aculeatus*

Con objeto de estudiar la formación de OS mediante la hidrólisis de la lactulosa con β -galactosidasa de *A. aculeatus*, se realizaron diferentes ensayos utilizando lactulosa (650 g/L en tampón fosfato 0,1 M pH 6,5; 60°C y 7 horas de reacción). La figura R15 muestra el perfil cromatográfico obtenido del análisis por HPAEC-PAD de los carbohidratos presentes en la mezcla de síntesis.

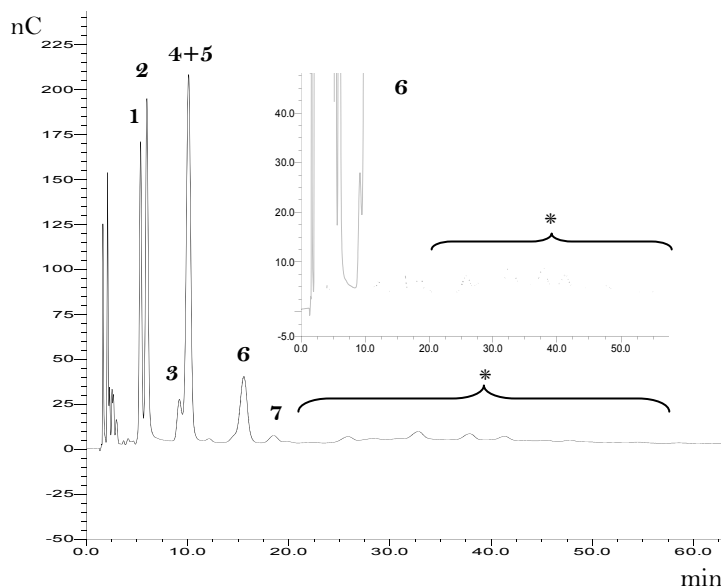


Figura R15.- Perfil cromatográfico obtenido mediante el análisis por HPAEC-PAD de la mezcla de síntesis resultante de la hidrólisis enzimática de lactulosa con la β -galactosidasa de *A. aculeatus*: 16 U/mL E, 650 g/L lactulosa en tampón fosfato 0,1 M pH 6,5, 60°C y 7 horas de reacción.

Picos: 1: Galactosa; 2: Fructosa; 3: β -D-Galp(1→6)-D-Galp (6'-galactobiosa); 4: tentativamente β -D-Galp(1→6)-D-Fruf (alolactulosa); 5: Lactulosa; 6: tentativamente β -D-Galp(1→6)- β -D-Galp(1→4)-D-Fruf (6'-galactosil-lactulosa); 7: β -D-Galp(1→4)- β -D-Fruf(1→1)-D-Galp (1-galactosil-lactulosa); * Otros oligosacáridos (OOS).

La identificación de cada uno de los picos se realizó mediante la comparación de tiempos de retención con los patrones comerciales y con los de los OS sintetizados e identificados previamente (Apartado 4.1.1.1), así los picos 1, 2, 3 y 5 corresponden a galactosa, fructosa, galactobiosa (β -D-Galp(1→6)-D-Galp) y lactulosa y los picos 4, 6 y 7 a β -D-Galp(1→6)-D-Galp (alolactulosa); β -D-Galp(1→6)-D-Galp(1→6)-D-Fruf (6'-galactosil-lactulosa); y β -D-Galp(1→4)-D-Fruf(1→1)-D-Galp (1-galactosil-lactulosa), respectivamente. El perfil cromatográfico de los OS sintetizados muestra que el mayoritario es la 6'-galactosil-lactulosa. La estructura del trisacárido se confirmó en la fracción aislada por HPLC-RI.

En la figura R16 se muestra, a modo de ejemplo, el perfil cromatográfico obtenido para una de las mezclas de reacción.

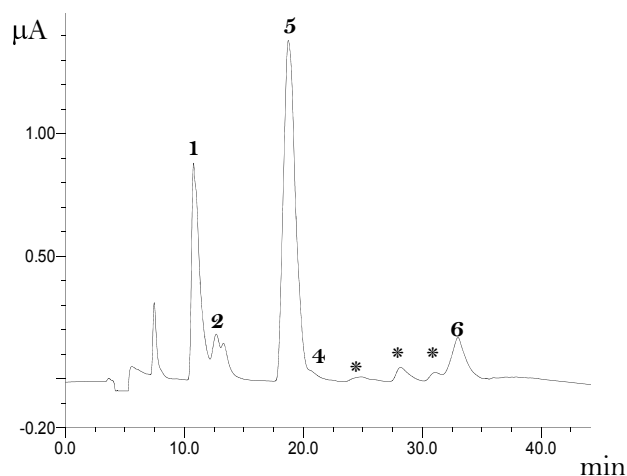


Figura R16.- Perfil cromatográfico de la mezcla de carbohidratos obtenidos mediante el análisis por HPLC-RI de las mezclas de síntesis obtenidas de la hidrólisis enzimática de lactulosa con la β -galactosidasa de *A. aculeatus*: 16 U/mL de enzima, 450 g/L de lactulosa tras 7 horas a 60°C y pH 6,5.

Picos: **1**: fructosa; **2**: galactosa; **5**: lactulosa; **4**: alolactulosa; **6**: 6' galactosil lactulosa; * Otros oligosacáridos (OOS).

El análisis mediante MS de dicha fracción pura confirmó que el compuesto era un trisacárido, presentando una masa molecular de 504 uma. Asimismo, el análisis por RMN tanto de ^{13}C como de ^1H verificó que dicho compuesto era, como se esperaba tras el análisis cromatográfico y de masas, la 6'-galactosil-lactulosa. Sus espectros y desplazamientos químicos coincidieron con los obtenidos con la 6'-galactosil-lactulosa obtenida con la β -galactosidasa de *K. lactis*.

4.1.1.2.1. Estudio de las condiciones óptimas de síntesis

Se ha estudiado la influencia de diferentes parámetros en la hidrólisis y transglucosilación de la lactulosa mediante la actividad β -galactosidasa de *A. aculeatus* de la preparación enzimática comercial Pectinex Ultra SP-L.

Efecto de la temperatura

Para llevar a cabo el estudio de la influencia de la temperatura se realizaron diferentes ensayos en discontinuo a distintas temperaturas, 40, 50 y 60°C utilizando disoluciones de lactulosa (650 g/L) a pH 6,5 y 16 U/mL de β -galactosidasa. Los oligosacáridos formados, así como el resto de carbohidratos presentes en la mezcla de reacción se cuantificaron por HPAEC-PAD (Método B,

ver Materiales y Métodos, Apartado 3.5.2.1). En la figura R17 se reflejan los resultados obtenidos. Como se muestra en dicha figura (a y b), el porcentaje de monosacáridos aumenta al aumentar la temperatura de 40 a 60°C, esto junto con los datos obtenidos para la lactulosa (Figura R17c), parece indicar que la velocidad de hidrólisis aumenta con la temperatura así como la formación de los productos de transgalactosilación (Figura R17 d, e y f). La cantidad de galactosa (Figura R17a) presente en la mezcla de reacción fue menor que la hallada para la fructosa en todos los ensayos realizados, esto coincide con la formación de OS encontrada. La formación de disacáridos (Figura R17d) fue máxima a 50°C alcanzando niveles de hasta un 10% después de 24 h de reacción. Este hecho, junto con la liberación de galactosa indica que la hidrólisis de lactulosa está favorecida a 50°C.

La formación de los productos de transglicosilación también aumentó con la temperatura, obteniendo el máximo rendimiento (~15%) de 6'-galactosil-lactulosa a 60°C después de 7 h de reacción. Posteriormente se observa una progresiva disminución alcanzando un 10% al final de la reacción (24h). Esto indica que el trisacárido es susceptible de ser hidrolizado por la β -galactosidasa. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Van Casteren y col., (2000) quienes obtienen un máximo de formación de oligosacáridos derivados de la lactosa utilizando β -galactosidasa de *A. aculeatus* a temperaturas comprendidas en el rango 55-60°C.

El resto de oligosacáridos cuantificados como OOS (Figura R17f) alcanzan su valor máximo a las 3 h de reacción a 50°C (15,72%) disminuyendo a tiempos superiores. Debido a que a 50°C la formación de disacáridos está favorecida, probablemente, entre estos OOS se encuentren no sólo trisacáridos sino también disacáridos. A 40 y 60°C las diferencias son mínimas. La Figura R17g muestra el total de oligosacáridos formados (OS_t) incluyendo disacáridos; tal y como puede observarse en la gráfica, a 60°C tiene lugar la máxima formación con un 30% de rendimiento.

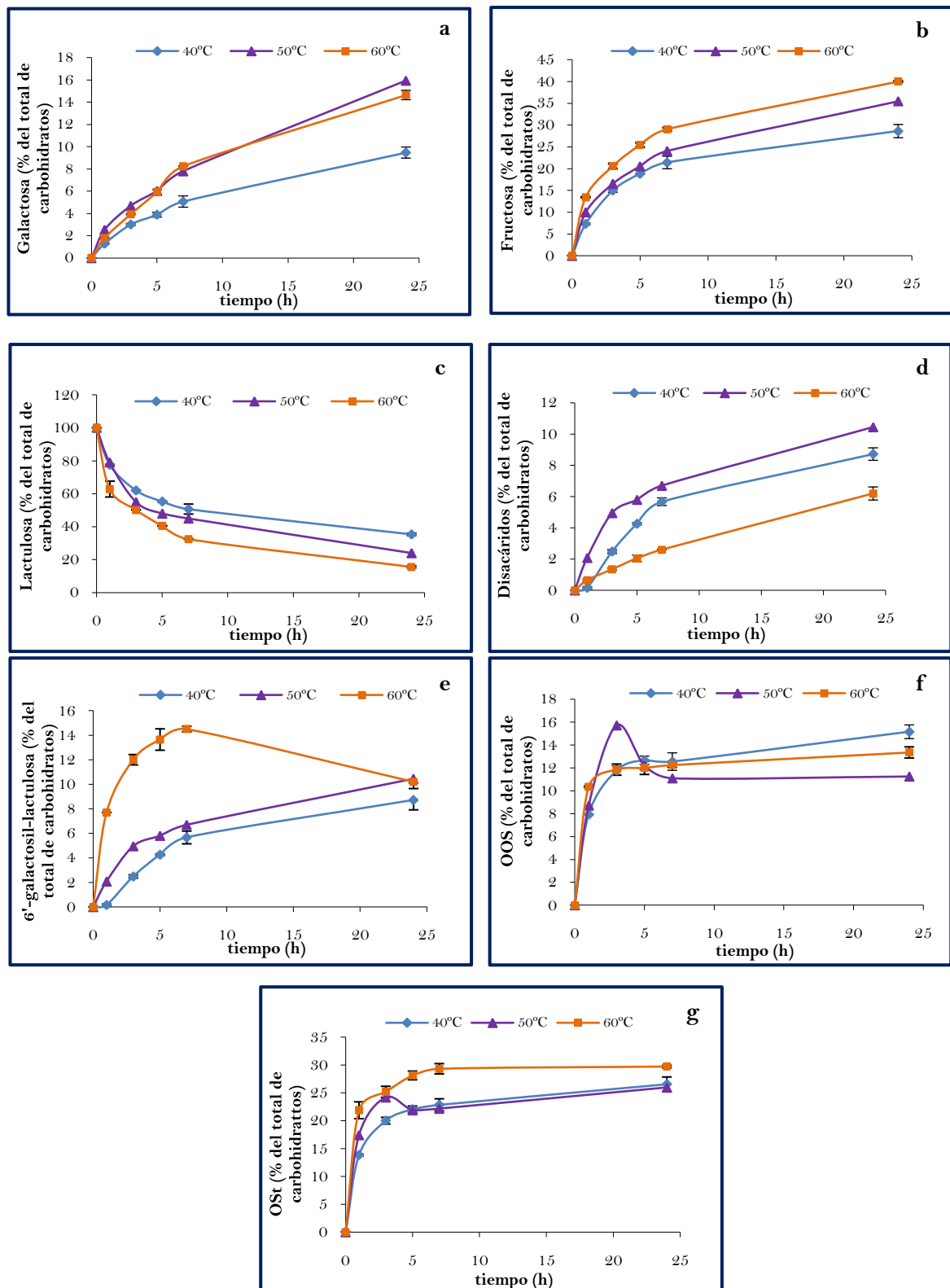


Figura R17.—Efecto de la temperatura en la producción de oligosacáridos durante la hidrólisis enzimática de lactulosa (650 g/L) con la β -galactosidasa (16 U/mL) de *A. aculeatus* (Pectinex Ultra) a pH 6,5. OOS: otros oligosacáridos presentes en la mezcla de reacción. OST: oligosacáridos totales.

Efecto del pH

Una vez estudiada la influencia de la temperatura y seleccionada aquélla para la cual se obtenía un mejor rendimiento en la formación de OS derivados de la lactulosa, se estudió la influencia del pH. Las condiciones de síntesis utilizadas fueron: 650 g/L de lactulosa, 16 U/mL de β -galactosidasa y 60°C, siendo los pH estudiados: 4,5, 5,5 y 6,5.

Los resultados obtenidos se reflejan en la Figura R18. Las Figuras R18 a y c ponen de manifiesto respectivamente, una mayor liberación de galactosa y una mayor hidrólisis de lactulosa a pH 4,5 y 5,5. Por tanto, bajo esas condiciones, la hidrólisis está favorecida dando lugar a una mayor formación de disacáridos, tal y como se muestra en la figura R18d. La formación máxima de los disacáridos se produce a pH 5,5 (12,4% a las 2 h de reacción), sin embargo, comienza a disminuir rápidamente, mientras que a pH 4,5 parece que dicha formación aumenta progresivamente hasta las 7 h para, posteriormente, mantenerse. Por otro lado, a pH 6,5 se ve favorecida claramente la formación del trisacárido 6'-galactosil-lactulosa (Figura R18e) alcanzando un rendimiento de ~15% a las 7 h de reacción. Los OOS alcanzan el valor máximo en las primeras horas de reacción, a los tres pH estudiados, manteniéndose prácticamente los mismos valores a las 24 h de reacción. No se han estudiado valores de pH más altos debido a que varios trabajos de síntesis de GOS con lactosa (Van Casteren y col., 2000; del Val y Otero, 2003), han demostrado que la actividad β -galactosidasa del Pectinex Ultra SP-L estaría fuera de su valor óptimo.

Efecto de la concentración de lactulosa

En la figura R19 se muestra la evolución de los diferentes carbohidratos presentes en las mezclas de reacción así como de los productos obtenidos mediante la reacción enzimática de la lactulosa a diferentes concentraciones con la β -galactosidasa de *A. aculeatus*. Como puede observarse en la figura R19 (a y b) apenas existen diferencias en los porcentajes de galactosa y fructosa presentes en la mezcla de reacción a las cuatro concentraciones de lactulosa ensayadas. Se observa un ligero aumento en la proporción de galactosa cuando se utilizan 250 g/L, indicando que a esta concentración se produce un porcentaje mayor de hidrólisis. La formación de 6'-galactosil-lactulosa (Figura R19e) fue similar en el rango de concentraciones ensayadas de 250-650 g/L, sin embargo cuando se emplean 850 g/L se observa una menor formación hidrolizándose rápidamente sin llegar a alcanzarse, por esta razón, adecuados rendimientos. Este hecho podría justificar que, a esta concentración, exista un mayor porcentaje de disacáridos (Figura R19d). El rendimiento máximo obtenido para los OOS (Figura R19f) se

obtuvo a un menor tiempo de reacción (3 h) utilizando 450 y 650 g/L de lactulosa.

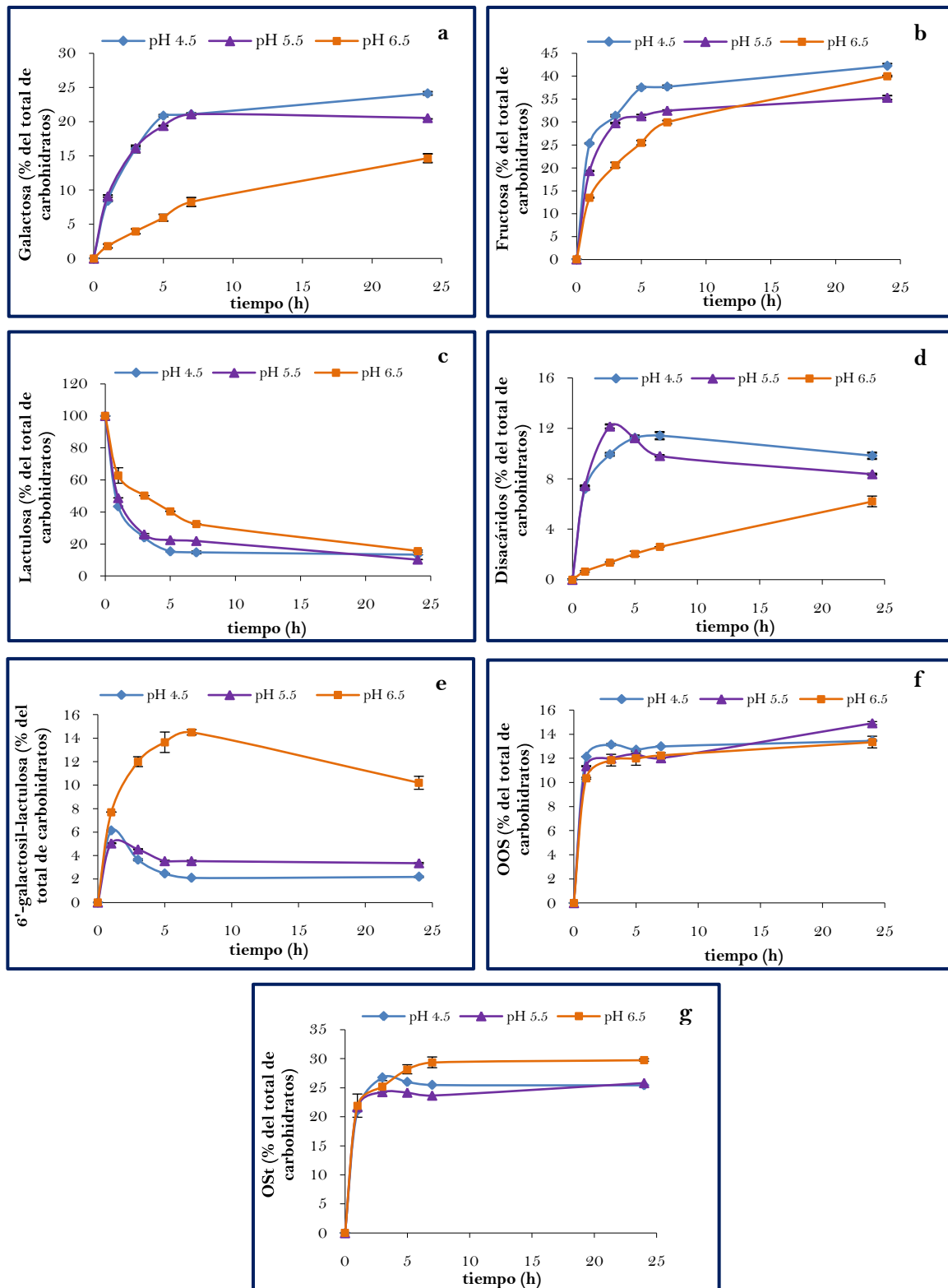


Figura R18.- Efecto del pH en la producción de oligosacáridos durante la hidrólisis enzimática de lactulosa (650 g/L) con la β -galactosidasa (16 U/mL) de *A. aculeatus* (Pectinex Ultra) a 60°C. OOS: otros oligosacáridos presentes en la mezcla de reacción. OST: oligosacáridos totales.

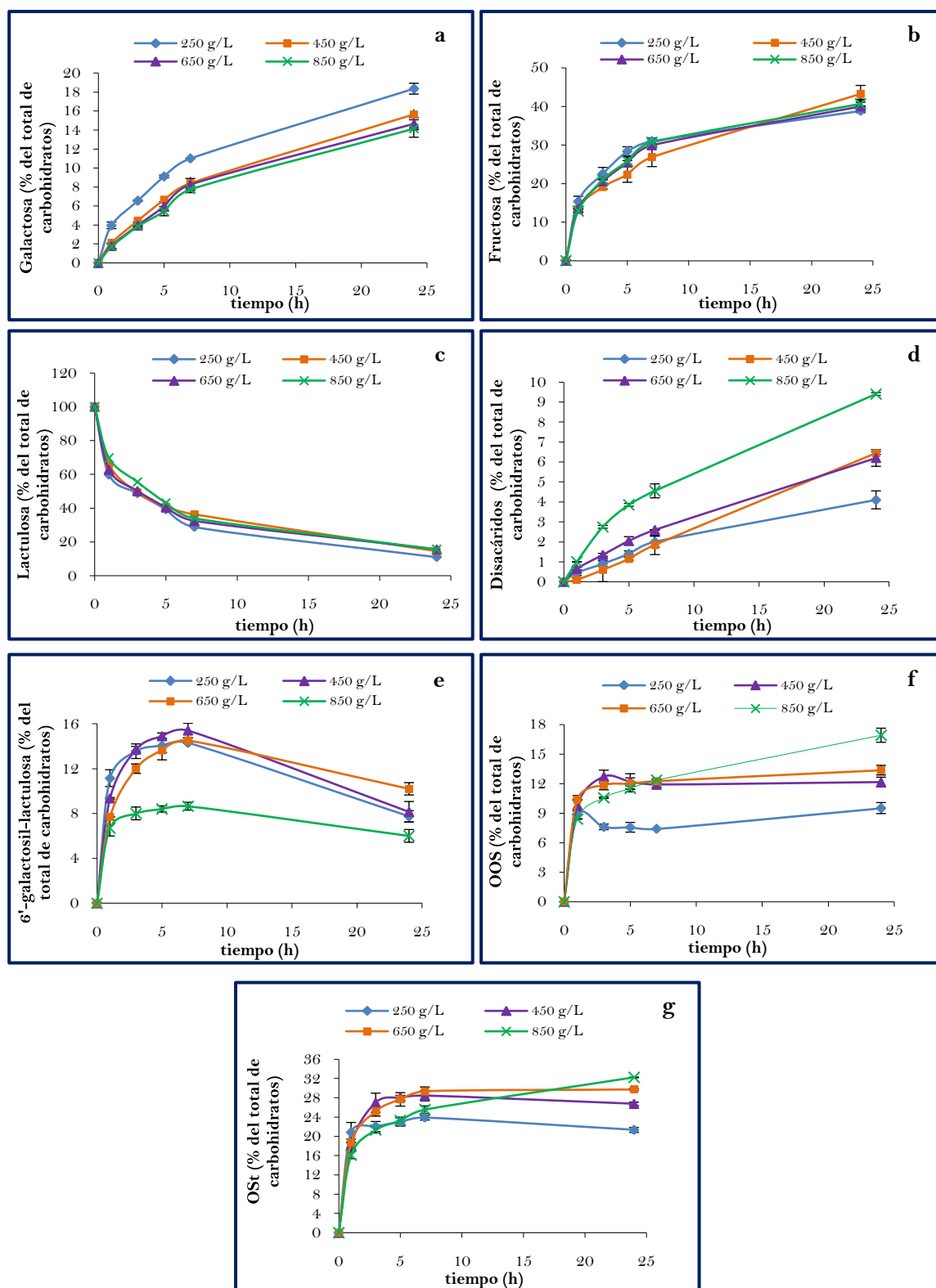


Figura R19.- Efecto de la concentración de sustrato en la producción de oligosacáridos durante la hidrólisis enzimática de la lactulosa con la β -galactosidasa (16 U/mL) de *A. aculeatus* (Pectinex Ultra) a pH 6,5 y 60°C. OOS: otros oligosacáridos presentes en la mezcla de reacción. OST: oligosacáridos totales

Efecto de la concentración de enzima

Por último, para estudiar el efecto de la concentración de enzima, se hicieron ensayos utilizando 8 U/mL, 16 U/mL y 24 U/mL de β -galactosidasa de *A. aculeatus* (Pectinex Ultra SP-L). Las reacciones se llevaron a cabo a 60°C y pH 6,5, utilizando 450 g/L de lactulosa. En la Figura R20 se reflejan los resultados obtenidos. El porcentaje de galactosa (Figura R20a) fue menor con 8 U/mL, no encontrándose diferencias importantes en las otras concentraciones de enzima utilizadas (16 y 24 U/mL). Estos resultados indican que, a estas dos últimas concentraciones, el porcentaje de hidrólisis es mayor que con 8 U/mL. La liberación de fructosa (Figura R20b) al medio de reacción, a tiempos cortos, es mayor al aumentar la concentración de enzima utilizada, lo que indica que la velocidad de hidrólisis aumenta. Como puede observarse en la figura R20e, durante las 7 primeras horas de reacción el rendimiento de la 6'-galactosil-lactulosa aumenta al pasar de 8 a 16 U/mL, sin embargo, a partir de las 7 h el trisacárido comienza a hidrolizarse con 16 U/mL mientras que con 8 U/mL su formación sigue aumentando. Cuando se utilizan 24 U/mL de enzima la formación del trisacárido es considerablemente inferior, a cualquiera de los tiempos ensayados, respecto a las otras concentraciones empleadas. En relación a la formación de los disacáridos (Figura R20d) aumenta cuanto mayor es la cantidad de enzima añadida al medio de reacción, confirmando que la hidrólisis de los trisacáridos presentes en la mezcla de reacción se ve favorecida.

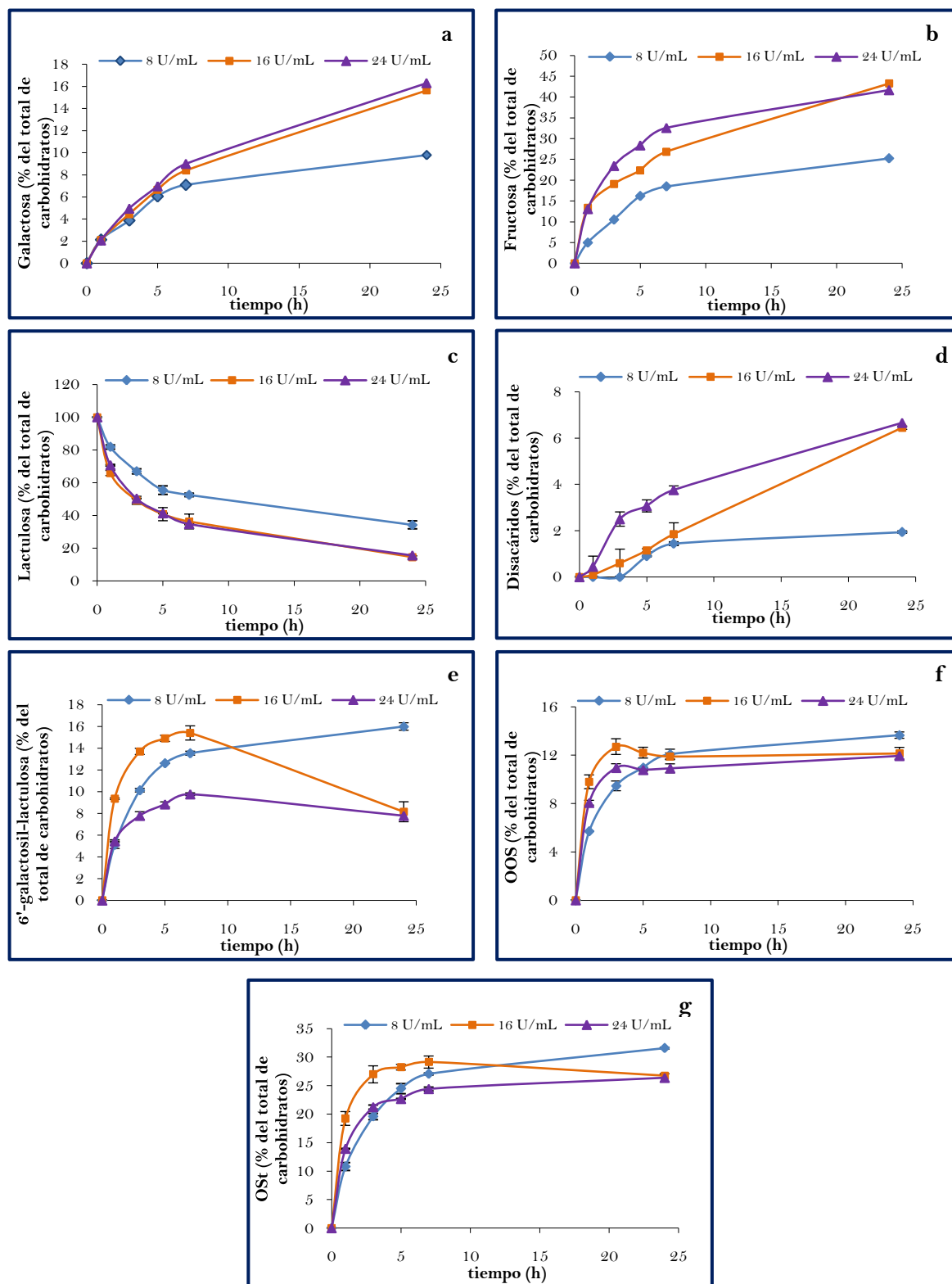


Figura R20.- Efecto de la concentración de enzima en la producción de oligosacáridos durante la hidrólisis enzimática de lactulosa (450g/L) con la β -galactosidasa de *A. aculeatus* (Pectinex Ultra) a pH 6,5 y 60°C. OOS: otros oligosacáridos presentes en la mezcla de reacción. OSt: oligosacáridos totales.

Efecto inhibitorio de los productos de reacción

Se ha llevado a cabo un estudio acerca de la posible inhibición, por parte de la galactosa y la fructosa en la hidrólisis de lactulosa con la β -galactosidasa de *A. aculeatus*. Como puede observarse en la tabla R2, después de 6 h de reacción, la cantidad de lactulosa consumida disminuyó cuando se le añadió galactosa al medio de reacción, sin embargo, no se observó inhibición cuando se añadió fructosa. En cuanto a la formación de la 6'-galactosil-lactulosa, la adición de galactosa inhibió en mayor medida que la fructosa para cantidades iguales añadidas. En el resto de oligosacáridos (OOS) presentes en la mezcla, sólo se observó inhibición por parte de la galactosa. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en estudios de inhibición de los monosacáridos en la formación de GOS derivados de la lactosa con β -galactosidasa de *A. aculeatus* (del Val y col., 2001; Chochchaisawasdee y col., 2005), en los que se encontró que la galactosa fue un inhibidor competitivo para los sitios activos de la enzima.

En resumen, la β -galactosidasa de *A. aculeatus* sufrió inhibición únicamente por parte de la galactosa, mientras que la β -galactosidasa de *K. lactis* la sufrió por parte de ambos monosacáridos (Apartado 4.1.1.1.2).

Tabla R2.-Efecto de la adición de monosacáridos en la producción de oligosacáridos y degradación de lactulosa durante la reacción de transgalactosilación a 60°C, durante 6 h de reacción utilizando mezclas de lactulosa (250 g/L) y 16 U/mL de enzima en tampón fosfato 0,1 M pH 6,5.

Contenido en la mezcla de reacción (% de carbohidratos totales)					
Monosacáridos añadidos	(g/L)	Lactulosa remanente	Disacáridos	6'-galactosil- lactulosa	OOS*
Ninguno	0	34,1	1,7	14,2	7,5
Galactosa	95	55,9	3,0	3,0	6,3
	190	53,5	3,2	2,1	5,5
	285	52,2	2,6	0,3	5,5
Fructosa	95	33,1	2,3	9,8	7,3
	190	32,8	3,3	6,9	7,3
	285	30,8	4,0	3,9	7,3

*Otros oligosacáridos presentes en las mezclas de reacción.

4.1.1.3. β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*

4.1.1.3.1. Síntesis y caracterización de oligosacáridos obtenidos con la enzima soluble

La Figura R21 muestra el perfil cromatográfico obtenido por HPAEC-PAD de la mezcla de carbohidratos obtenida tras la hidrólisis enzimática a 50°C de la lactulosa (450 g/L) en tampón fosfato pH 6,5 con β -galactosidasa de *A.oryzae* (16 U/mL).

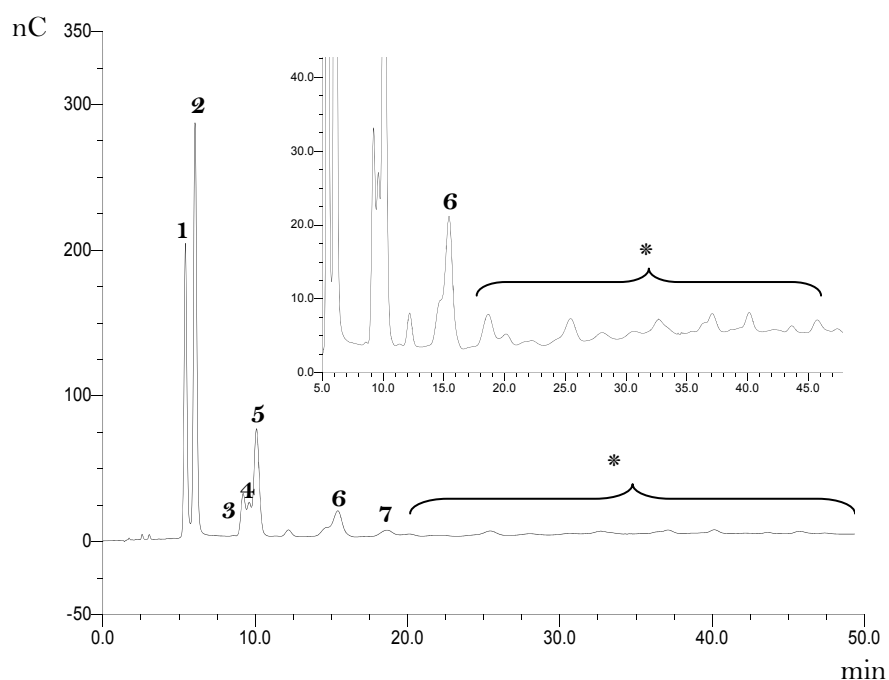


Figura R21.- Perfil cromatográfico obtenido mediante el análisis por HPAEC-PAD de la mezcla resultante de la hidrólisis enzimática de la lactulosa con la β -galactosidasa de *A. oryzae* : 16 U/mL de enzima, 450 g/L de lactulosa en tampón fosfato 0,1 M, pH 6,5, 50°C y 1 hora de reacción.

Picos: 1: galactosa; 2: fructosa; 3: β -D-Galp-(1→6)-D-Galp (6-galactobiosa); 4: β -D-Galp-(1→6)-D-Fruf (alolactulosa); 5: lactulosa; 6: β -D-Galp-(1→6)- β -D-Galp-(1→4)-D-Fruf (6' galactosil lactulosa); 7: β -D-Galp(1→4)- β -D-Fruf(1→1)-D-Galp (1-galactosil-lactulosa); *:Otros OS (OOS).

Tal y como puede observarse en el cromatograma, el perfil fue muy similar al obtenido tras la hidrólisis de la lactulosa con la β -galactosidasa de *A. aculeatus*, lo que facilitó la identificación de los distintos OS formados. Así, y al utilizar el mismo método cromatográfico, pudieron identificarse, por comparación de los tiempos de retención, además de los monosacáridos galactosa y fructosa (picos 1 y 2, respectivamente) y la lactulosa (pico 5) los picos 3, 4, 6 y 7 como β -D-Galp-

(1→6)-D-Galp (6-galactobiosa), β -D-Galp-(1→6)-D-Fruf (alolactulosa), β -D-Galp-(1→6)-D-Lu (6'-galactosil-lactulosa), y β -D-Galp(1→4)- β -D-Fruf(1→1)-D-Galp, respectivamente. De la misma manera que para la hidrólisis llevada a cabo con la β -galactosidasa de *A. aculeatus*, la 6-galactobiosa (pico 3) se identificó utilizando un patrón comercial mientras que el pico 6, que fue el compuesto mayoritariamente formado, se identificó por comparación del tiempo de retención con el de un patrón puro obtenido en el laboratorio tras la purificación de la mezcla de reacción producida con la β -galactosidasa de *A. aculeatus*. La alolactulosa, también pudo identificarse por comparación del tiempo de retención con el de un patrón obtenido en el laboratorio.

Con objeto de completar la identificación del compuesto mayoritario (6'-galactosil-lactulosa) se procedió al análisis por HPLC-RI de las mezclas de reacción, recogándose la fracción correspondiente al pico 6 a la salida del detector para su posterior caracterización por RMN. El espectro de ^{13}C confirmó que era la 6'-galactosil-lactulosa.

En la figura R22 se muestran a modo comparativo los perfiles cromatográficos de los OS formados durante la hidrólisis y transgalactosilación con β -galactosidasas de *K. lactis* (Lactozym), *A. aculeatus* (Pectinex Ultra SP-L) y *A. oryzae*.

Como puede observarse en la figura, los perfiles cromatográficos muestran claramente como, en el caso de la reacción llevada a cabo con la β -galactosidasa de *K. lactis* son dos los trisacáridos formados mayoritariamente (picos 6 y 7) mientras que en el caso de las β -galactosidasas de *A. aculeatus* y *A. oryzae*, con un perfil más parecido, se forma únicamente de forma mayoritaria uno de los trisacáridos (pico 6). En el caso de la β -galactosidasa de *A. oryzae*, debido a la mayor hidrólisis de la lactulosa (pico 5), en el perfil cromatográfico puede observarse como, efectivamente, tiene lugar la formación de alolactulosa (pico 4), que en los otros dos casos no es posible cuantificar debido a la coelución con la lactulosa. Además, en el caso de las β -galactosidasas del género *Aspergillus* se observa como se forman en mayor proporción otros oligosacáridos con mayor tiempo de retención que los trisacáridos 6 y 7.

Una vez identificados los OS formados, también se realizó el estudio de optimización de las condiciones de reacción en la síntesis de los OS derivados de lactulosa estudiando la influencia de la temperatura, pH, concentración de enzima y tiempo de reacción.

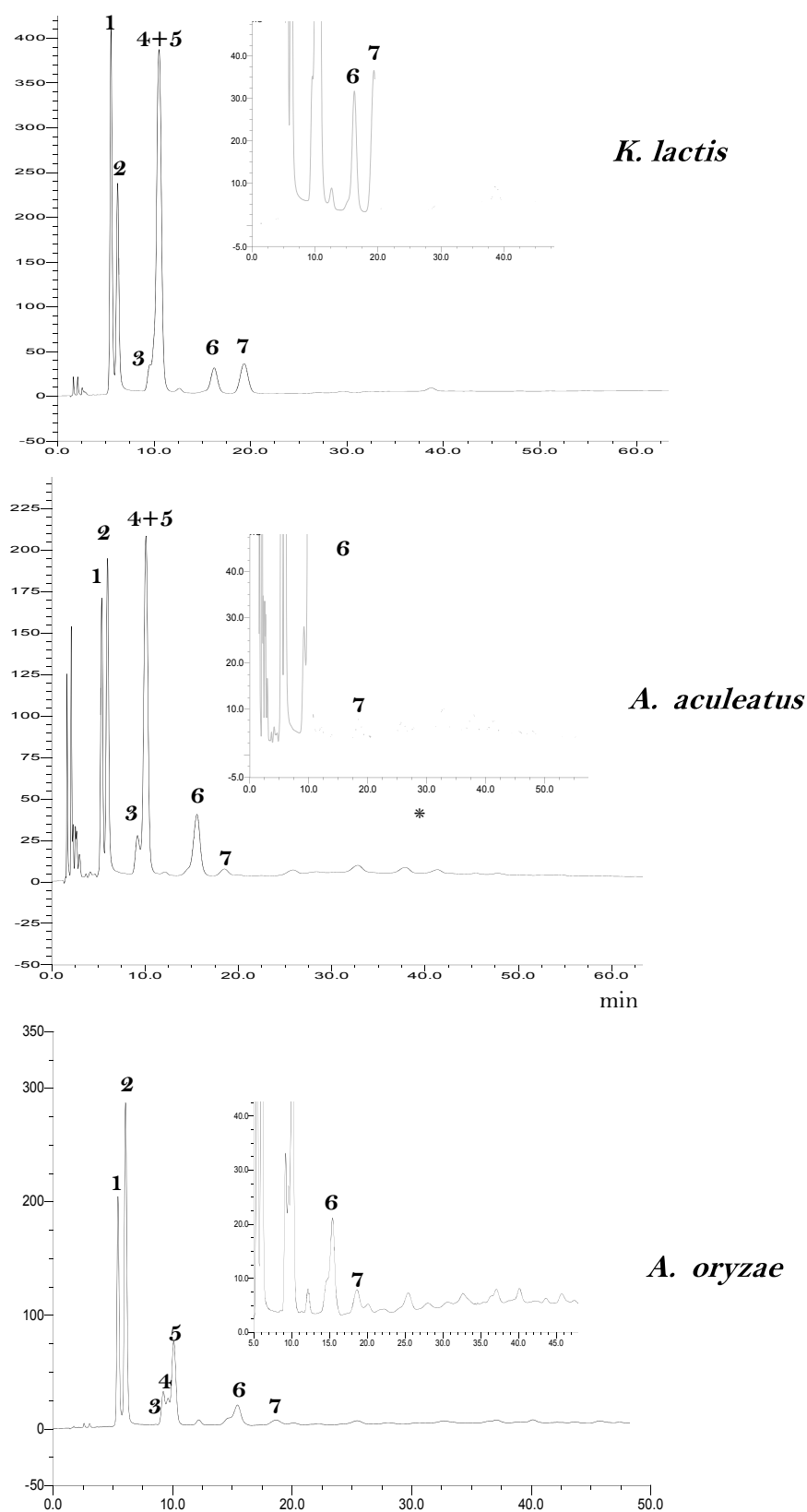


Figura R22.- Perfiles cromatográficos de los productos resultantes de la hidrólisis de lactulosa con las β -galactosidasas de *K. lactis* (Lactozym 3000 L HP G), *A. aculeatus* (Pectinex Ultra SP-L) y *A. oryzae*.

Efecto de la concentración de la enzima

Las condiciones inicialmente empleadas para la síntesis de OS derivados de lactulosa y β -galactosidasa de *A. oryzae* fueron las seleccionadas como óptimas para la β -galactosidasa de *A. aculeatus* (Pectinex Ultra SP-L), ya que por pertenecer al mismo género y a la vista de la similitud de sus perfiles cromatográficos, cabía esperar que se comportasen de forma similar. Así, los análisis de las mezclas de reacción llevadas a cabo con 16 U/mL de enzima, 50°C, 450 g/L de lactulosa en tampón fosfato sódico 0,1 M pH 6,5 durante 24 h de reacción, mostraron una formación muy rápida de OS, siendo el mayor rendimiento logrado para la 6'-galactosil-lactulosa de tan solo un 7,99% a 1 h de reacción. Por ello, se ensayaron las mismas condiciones pero con una concentración de enzima menor (8 U/mL).

De esta manera, el rendimiento de la 6'-galactosil-lactulosa aumentó en, aproximadamente, un 15%, siendo el rendimiento de todos los OS formados cercano a un 50%. A la vista de los resultados, dicha concentración de enzima (8 U/mL) se empleó para estudiar el resto de las condiciones de reacción.

Efecto de la temperatura.

Para estudiar el efecto de la temperatura se llevaron a cabo ensayos a dos temperaturas diferentes 50 y 60°C utilizando disoluciones de lactulosa (450 g/L) a pH 6,5 y 8 U/mL de enzima. En la figura R23 se muestran los resultados obtenidos. Como puede observarse, el porcentaje de monosacáridos aumentó al aumentar la temperatura de 40 a 60°C, sin embargo la hidrólisis de lactulosa (Figura 23e) resultó ser muy parecida a las dos temperaturas ensayadas.

Como se puede ver en la figura R23f, los resultados muestran que la temperatura óptima para la formación del trisacárido 6'-galactosil-lactulosa es 50°C (~20% de rendimiento tras 5 h de reacción), mientras que para la formación de los disacáridos es 60°C alcanzando porcentajes cercanos al 8 y al 15% a las 5 horas de reacción para la 6-galactobiosa (Figura R23c) y la alolactulosa (Figura R23d), respectivamente. Esto indica, junto con la liberación de galactosa que, a esta última temperatura, la degradación de los oligosacáridos está favorecida. La concentración del resto de oligosacáridos cuantificados como OOS (Figura R23g) alcanzó su valor máximo a tan sólo 1 h de reacción a 50°C (20%), disminuyendo a tiempos superiores. Por tanto, la temperatura elegida para los siguientes ensayos fue 50°C.

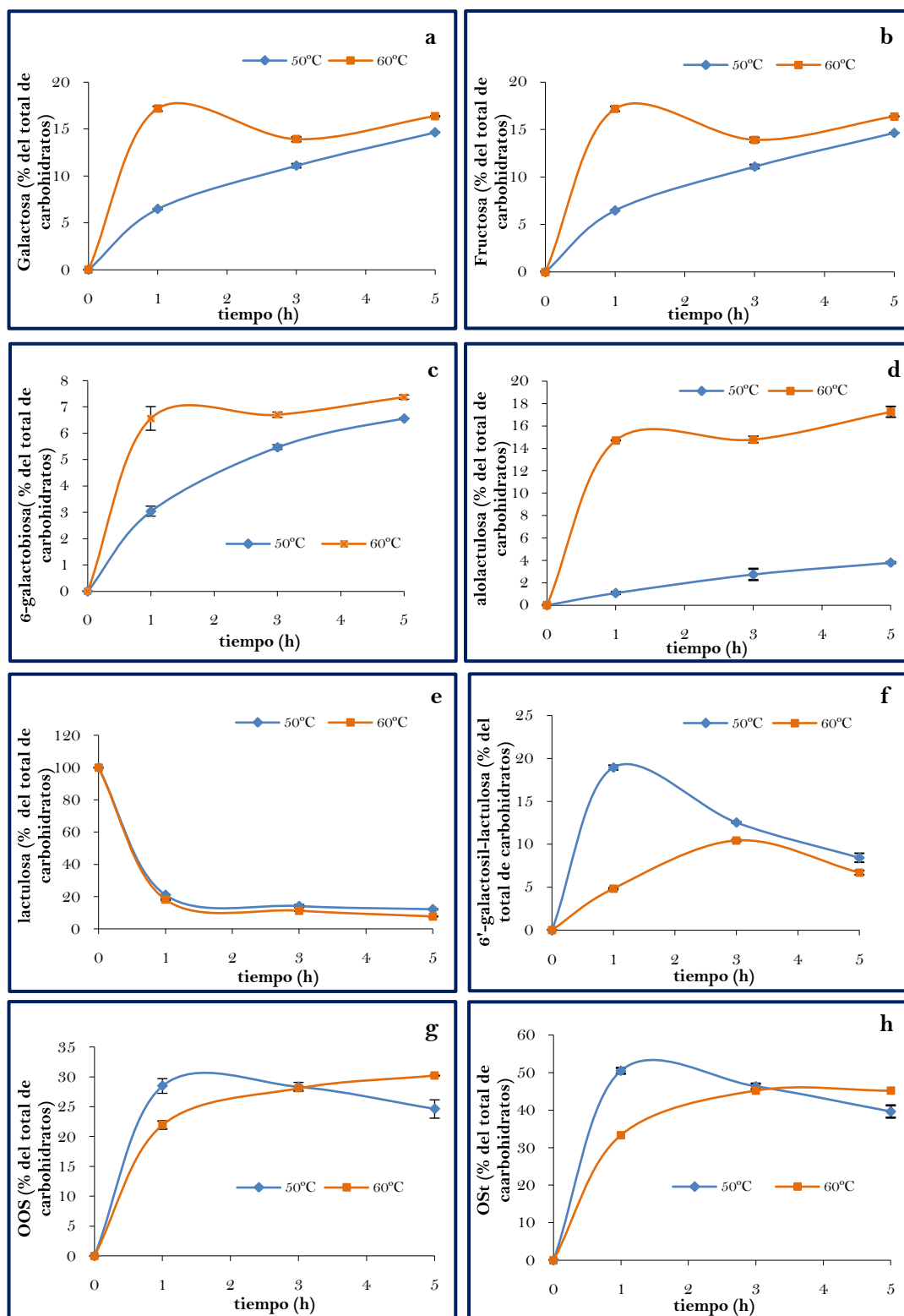


Figura R23.—Efecto de la temperatura en la producción de oligosacáridos durante la hidrólisis enzimática de lactulosa (450 g/L) con la β -galactosidasa de *A. oryzae* (8 U/mL) a pH 6,5. OOS: otros oligosacáridos presentes en la mezcla de reacción. OST: oligosacáridos totales.

Efecto del pH

Una vez estudiada la influencia de la temperatura se estudió la influencia del pH manteniendo los valores de concentración de lactulosa (450 g/L), enzima (8 U/mL) y temperatura (50°C) constantes. Los valores de pH estudiados fueron: 4,5 y 6,5.

Los resultados mostrados en la figura R24 indican una tendencia similar a la que se observó con la β -galactosidasa de *A. aculeatus*, debido probablemente a que ambas β -galactosidasas proceden del mismo género (*Aspergillus*). En las figuras R24a y b puede observarse una mayor liberación de galactosa y fructosa, respectivamente, a pH 4,5. Al mismo tiempo puede verse en la figura R25e una mayor hidrólisis de la lactulosa, lo que indica, por lo tanto, que bajo estas condiciones de pH, la hidrólisis está favorecida dando lugar a una mayor formación de disacáridos. La formación máxima de estos disacáridos se produce a pH 4,5 (~ 8% para ambos trisacáridos a las 3 h de reacción). Por otro lado, a pH 6,5 se ve favorecida claramente la formación del trisacárido 6'-galactosil-lactulosa (Figura R24f) alcanzándose, aproximadamente, un 20% tras 1 h frente a apenas un 8% a pH 4,5. En la formación de OOS (Figura R24g) no existen diferencias entre ambos pH tras 1 h de reacción, probablemente debido a que en este conjunto de compuestos se estén cuantificando no sólo trisacáridos y compuestos de mayor peso molecular sino también disacáridos.

En el caso de la utilización de la enzima soluble las condiciones óptimas que conducen a un mayor rendimiento de oligosacáridos (50%) estando la formación de trisacáridos especialmente favorecida (20% de la 6'-galactosil-lactulosa) fueron 50°C, pH 6,5 y 8 U/mL de enzima.

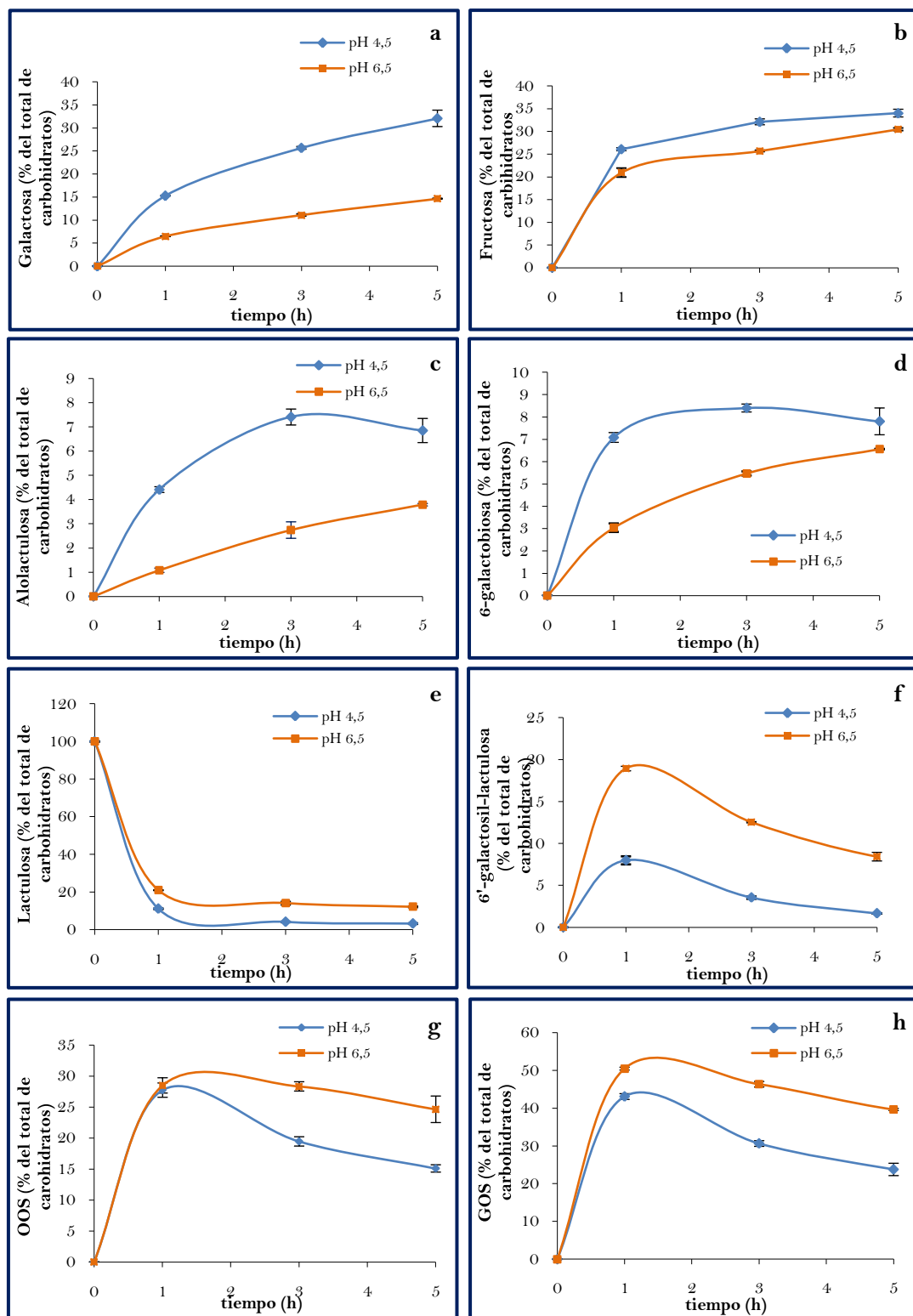


Figura R24.- Efecto del pH en los productos de reacción durante la hidrólisis enzimática de lactulosa (450 g/L) con la β -galactosidasa de *A. oryzae* (8 U/mL) a 50°C. OOS: otros oligosacáridos presentes en la mezcla de reacción.

A modo de resumen, se muestra, en la siguiente tabla, los mejores rendimientos obtenidos en la síntesis de oligosacáridos derivados de la lactulosa con las diferentes β -galactosidas utilizadas en este trabajo, así como las condiciones de reacción empleadas en cada uno de los casos.

Tabla R3.- Condiciones óptimas para la síntesis de oligosacáridos derivados de la lactulosa con β -galactosidasa de diferentes orígenes y rendimiento obtenido para los oligosacáridos presentes en las mezcla de reacción.

β -galactosidasa	Condiciones de reacción	Disacáridos	Trisacáridos	OOS	OS _t
<i>K. lactis</i> (Lactozym)	250 g/L lactulosa	4%	22%	1,82%	28%
	50 °C, pH 7,5, 2 h		10,4% 6'-galactosil-lactulosa 11,5% 1-galactosil-lactulosa		
<i>A. aculeatus</i> (Pectinex)	450 g/L lactulosa	3%	17%	10%	30%
	60 °C, pH 6,5, 7 h				
<i>A. oryzae</i>	450 g/L lactulosa	4%	20%	26%	50%
	50 °C, pH 6,5, 1 h				

En el caso de las β -galactosidasas de los preparados enzimáticos Pectinex Ultra SP-L y Lactozym 3000 L HP-G, el rendimiento alcanzado para los oligosacáridos formados es muy similares ($\sim 30\%$) mientras que para la β -galactosidasa de *A. oryzae* es mucho mayor ($\sim 50\%$).

4.1.1.3.2. Utilización de la β -galactosidasa inmovilizada

La inmovilización de enzimas es una técnica extensamente utilizada ya que presenta una serie de ventajas, frente a la utilización de la enzima en forma soluble, tales como su reutilización, la operación en continuo, la formación controlada del producto y la sencillez y eficacia del proceso. Los estudios llevados a cabo con lactosa se han centrado en intentar maximizar la producción de oligosacáridos, sin embargo, en muchos de estos casos, el rendimiento obtenido para los oligosacáridos disminuye hasta un 20-30% debido a las limitaciones por difusión. Además, los soportes utilizados en la inmovilización de la enzima son, mayoritariamente, micropartículas tales como resinas de intercambio iónico (Matsumoto y col., 1993), de alto precio y difíciles de escalar, lo que limita su uso a nivel industrial. Por ello, es muy importante seleccionar un soporte de adecuado para la inmovilización que permita minimizar este tipo de problemas. En esta memoria, la β -galactosidasa de *A. oryzae* se ha inmovilizado en un soporte de glutaraldehído-agarosa (Irazoqui y col., 2007). Este soporte es extensamente

utilizado para estabilizar la enzima frente a los cambios de temperatura y permite el uso de bajas concentraciones de cosolventes manteniéndose una importante actividad de la enzima, por lo que sería una buena alternativa al uso de la enzima soluble en la síntesis de OS derivados de la lactulosa.

Así, en primer lugar, se realizó la optimización de las condiciones de síntesis, estudiando, para ello, la influencia de la concentración de enzima, temperatura, pH y tiempo en la formación de OS derivados de la lactulosa, con el objetivo de comparar los resultados obtenidos con los de la enzima soluble y establecer las posibles ventajas o inconvenientes de la utilización de la enzima inmovilizada.

Efecto de la concentración de enzima

Las condiciones de síntesis empleadas para de la hidrólisis y transgalactosilación de la lactulosa, al igual que para el caso de la enzima soluble, se llevó a cabo utilizando lactulosa (450 g/L) en tampón fosfato sódico 0,1 M a pH 6,5 y cantidades variables de enzima, 8 y 16 U/mL. Los resultados obtenidos (datos no mostrados) indican que no existían grandes diferencias en la formación de oligosacáridos al emplearse ambas concentraciones de enzima. Así, los máximos rendimientos alcanzados para la formación de disacáridos son similares en ambos casos siendo de, aproximadamente, un 7% para la 6-galactobiosa y un 6% para la alolactulosa. Por otro lado, el rendimiento de la 6'-galactosil-lactulosa con 8 U/mL fue solamente un 5% mayor que con 16 U/mL mientras que en el caso de la enzima soluble esta diferencia era cercana a un 15%. El total de oligosacáridos formados (OSt) mostró claramente como la utilización de las diferentes concentraciones de enzima apenas afectó al rendimiento de los oligosacáridos formados puesto que, en ambos casos, se alcanzaron valores cercanos al 50%.

Efecto de la temperatura

Se llevaron a cabo diferentes ensayos a dos temperaturas diferentes, 50 y 60°C utilizando disoluciones de lactulosa (450 g/L) a pH 6,5 y 8 U/mL de enzima. Como se muestra en las figuras R25a y b, el porcentaje de monosacáridos aumentó al aumentar la temperatura de 40 a 60°C. Esto, junto con los datos mostrados en la gráfica de hidrólisis de la lactulosa (Figura R25e), parece indicar que la velocidad de reacción es más alta a 60°C que a 50°C. Sin embargo, en contraposición con la enzima soluble, las diferencias entre ambas temperaturas en cuanto a la formación de oligosacáridos son mucho menores. Concretamente, en el caso de los disacáridos, mientras que a 50°C sí es posible cuantificar la

alolactulosa (Figura R25c), no es posible hacerlo a 60°C puesto que al formarse seguramente en menor cantidad, no se produce una separación del pico con respecto al de la lactulosa. El rendimiento de la 6-galactobiosa (Figura 25d) es similar a ambas temperaturas al igual que el porcentaje de lactulosa remanente. En cuanto a la 6'-galactosil-lactulosa (Figura 25f), el rendimiento con ambas temperaturas es también similar, siendo aproximadamente de un 20% tras 1 h de reacción. Tras este tiempo se observa una hidrólisis mayor del trisacárido a 60°C que a 50°C debido a que la reacción es más rápida cuanto mayor es la temperatura. Sin embargo, cabe destacar que cuando la reacción se llevaba a cabo con la enzima soluble, se conseguía un rendimiento, aproximadamente, un 15% mayor a 50 que a 60°C.

Los OS totales (Figura R25h) alcanzan un rendimiento máximo del 50% tras 1 h de reacción, siendo prácticamente igual al obtenido con la β -galactosidasa soluble.

Los resultados obtenidos para los OS formados muestran que la inmovilización de la enzima incide en su estabilidad frente a los cambios de temperatura. Así, una variación de 10°C no genera apenas cambios en la formación de OS derivados de la lactulosa, siendo en ambos casos, la 6'-galactosil-lactulosa el compuesto formado en mayor proporción con un rendimiento de, aproximadamente, un 20%.

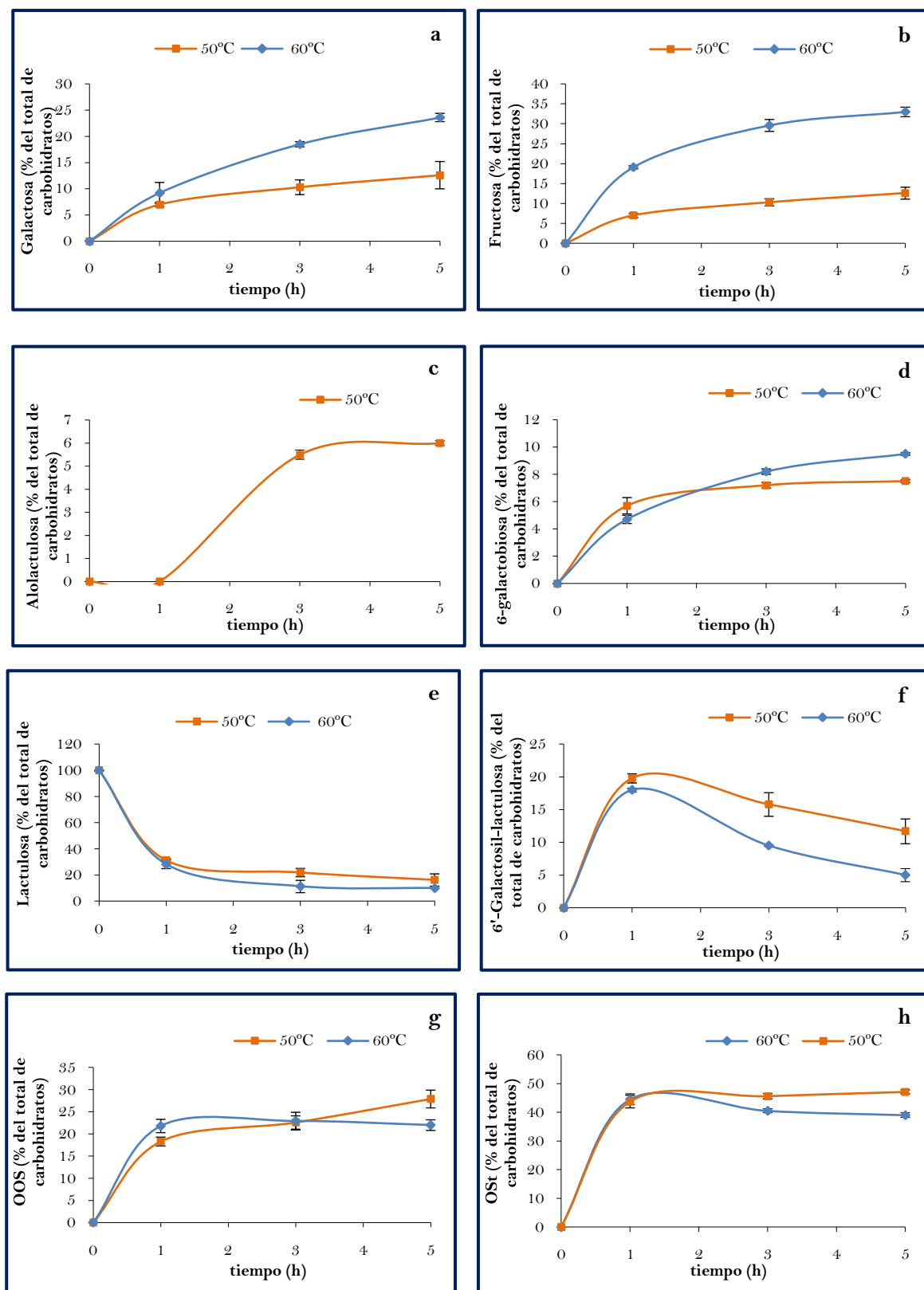


Figura R25.-Efecto de la temperatura en los productos de reacción durante la hidrólisis enzimática de lactulosa (450 g/L) con la β -galactosidasa de *A. oryzae* inmovilizada en un soporte de glutaraldehído-agarosa (8 U/mL) a pH 6,5. OOS: otros oligosacáridos presentes en la mezcla de reacción. OST: oligosacáridos totales.

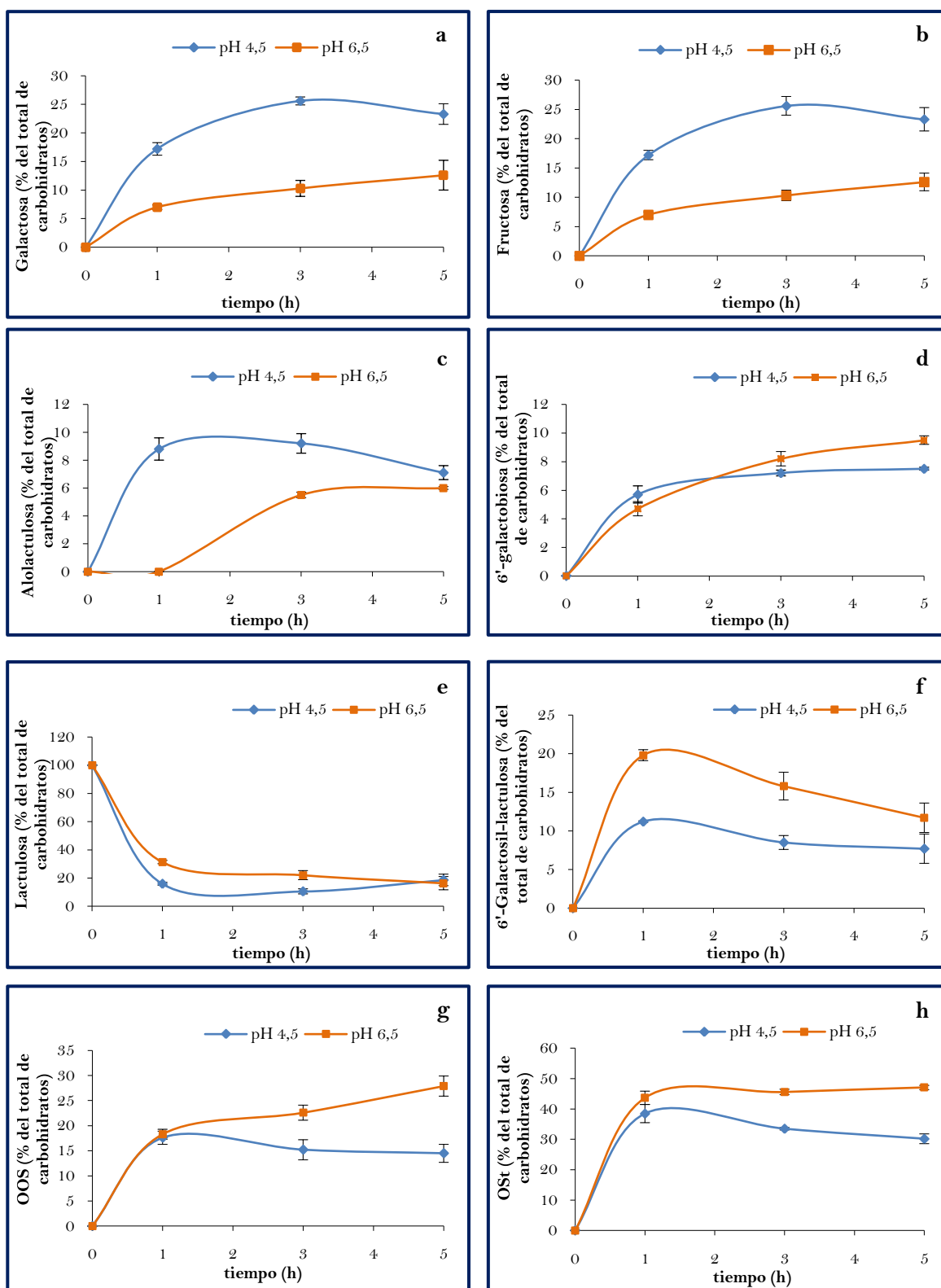


Figura R26.- Efecto del pH en la producción de oligosacáridos durante la hidrólisis enzimática de lactulosa (450 g/L) con la β -galactosidasa de *A. oryzae* (8 U/mL) inmovilizada en un soporte de glutaraldehído-agarosa, a 50°C. OOS: otros oligosacáridos presentes en la mezcla de reacción. OST: oligosacáridos totales.

Efecto del pH

Una vez estudiada la influencia de la temperatura, se estudió la influencia del pH. Los resultados mostrados en la figura R26 muestran una tendencia similar a la obtenida con la β -galactosidasa soluble alcanzando los rendimientos más altos de trisacáridos a pH 6,5 (20%) que a pH 4,5 (10%). Al igual que con la enzima soluble, la formación de disacáridos está, sin embargo, favorecida a pH 4,5 puesto que la reacción de hidrólisis es mucho mayor en estas condiciones y, al haber más monosacáridos en el medio de reacción (aproximadamente un 30% más), la probabilidad de la formación de disacáridos es mucho mayor que la de trisacáridos.

Reutilización de la enzima

Una de las ventajas de utilizar enzimas inmovilizadas es la de su reutilización ya que permite rentabilizar el coste del proceso. En la tabla R4 se muestran los resultados obtenidos después de utilizar 10 veces la β -galactosidasa inmovilizada. Como puede observarse, la hidrólisis y producción de OS es muy parecida en las 10 reacciones teniendo una RSD (%) de 3,56%. Por lo tanto, es posible utilizar la enzima inmovilizada hasta diez veces con tan sólo un 4% de disminución el rendimiento de OOS.

Tabla R4.- Reutilización de la enzima inmovilizada en glutaraldehído-agarosa. Condiciones de reacción: 450 g/L lactulosa en 0,1 M tampón fosfato (pH 6,5), 16 U/mL y 50°C.

Muestra	Carbohidratos (% del total de carbohidratos)					
	Gal	Fru	Lu	β -D-Galp(1 \rightarrow 6)- β -D-Galp	β -D-Galp(1 \rightarrow 6)-D-Lu	OOS
1	8,0	21,8	25,9	4,7	19,3	20,3
2	6,8	19,7	29,0	3,8	20,4	20,4
3	6,5	18,8	29,0	3,8	21,1	19,2
4	6,0	17,5	33,3	3,5	21,3	19,5
5	5,9	16,5	34,6	3,4	21,3	18,9
6	5,4	16,3	35,1	3,4	20,9	18,6
7	5,1	16,3	35,4	3,4	20,9	18,2
8	5,0	15,9	36,5	3,1	20,8	17,1
9	5,0	15,6	36,7	3,1	20,8	17,1
10	4,9	15,6	36,8	3,1	20,7	16,9

La utilización de la β -galactosidasa de *A. oryzae* inmovilizada en glutaraldehído-agarosa constituye una buena alternativa a la aplicación de la enzima soluble para la síntesis de oligosacáridos derivados de la lactulosa, dado que no sólo produce el elevado rendimiento conseguido para los OS_t con la enzima soluble (aproximadamente de un 50%), sino porque también la inmovilización incide en su estabilidad frente a los cambios de temperatura. Además, el soporte aquí empleado es un soporte extensamente utilizado en la industria y económicamente asequible. En un estudio reciente sobre, la producción de GOS mediante β -galactosidasa inmovilizada en partículas magnéticas de poliamida-polisiloxano, Neri y col., (2009) no encontraron diferencias significativas en las velocidades de reacción tanto de la hidrólisis como de la transgalactosilación, cuando se compararon con los resultados obtenidos con la enzima soluble. Tampoco se observaron cambios en la producción de GOS ni con el pH ni con la temperatura. Por lo que se refiere a la reutilización de la enzima, sólo se conservó un 84% de la actividad tras 10 reacciones.

4.1.2. Obtención de oligosacáridos derivados de la lactulosa por isomerización de galactooligosacáridos (GOS)

Dado que la obtención de trisacáridos derivados de la lactulosa mediante transgalactosilación, requiere la utilización de concentraciones relativamente altas de sustrato, otros tipos de estrategias en las que no se utilice la lactulosa como material de partida, pueden resultar también factibles e incluso económicamente más rentables. Tal es el caso de la isomerización en medio básico de los GOS, previamente obtenidos por reacción de la lactosa con β -galactosidasas.

4.1.2.1. Hidrólisis y transgalactosilación de la lactosa

Como paso previo a la isomerización, fue necesario llevar a cabo la síntesis de los GOS a partir de la lactosa. Para ello se utilizaron las β -galactosidasas de *K. lactis* y *A. aculeatus* de las preparaciones enzimáticas comerciales Lactozym 3000L HP G y Pectinex Ultra SP-L, respectivamente.

La síntesis de estos oligosacáridos se llevó a cabo en las condiciones óptimas de reacción, determinadas previamente para las dos enzimas. Así, para la β -galactosidasa de *A. aculeatus* las condiciones fueron 16 U/mL de enzima, 285 g/L de lactosa, pH 6,5 y 60°C y para la β -galactosidasa de *K. lactis*, 3 U/mL de enzima, 250 g/L, pH 7,5 y 40°C. El análisis de las mezclas de carbohidratos

obtenidas, se llevó a cabo por HPAEC-PAD utilizando dos métodos diferentes. Mediante el método A (Apartado 3.5.2.1 de Materiales y Métodos), se obtuvieron los perfiles cromatográficos que se muestran en la Figura R27 (a y b).

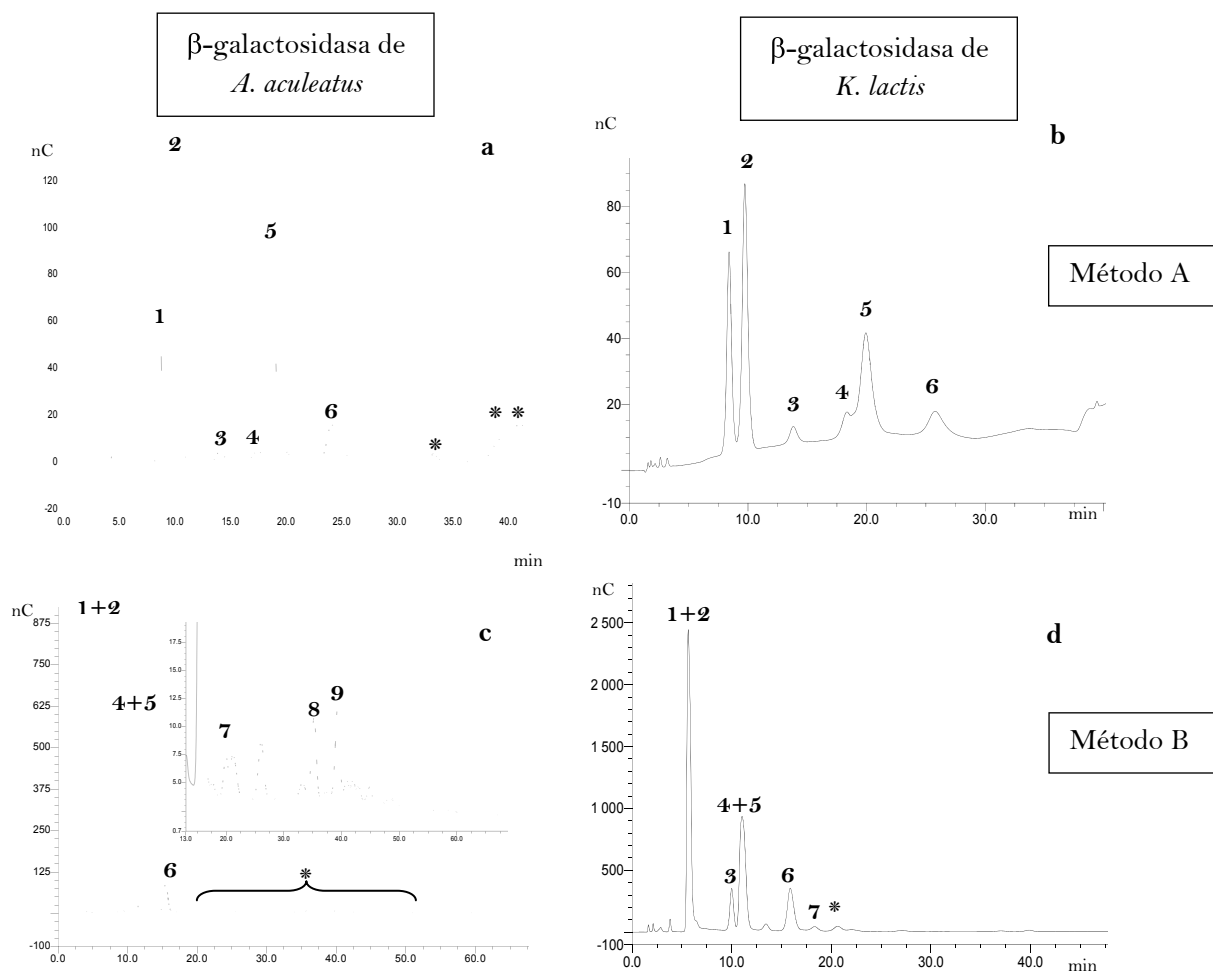


Figura R27.- Perfiles cromatográficos obtenidos mediante HPAEC-PAD de las mezclas de reacción obtenidas por hidrólisis enzimática de la lactosa con la β -galactosidasa de *A. aculeatus* (a y c): 16 U/mL de enzima, 285 g/L de lactosa, 7 horas a 60°C y pH 6,5 y la β -galactosidasa de *K. lactis* (b y d): 3 U/mL de enzima, 250 g/L de lactosa, 2 h a pH 6,5 y 40°C. a y b: Método A. b y c: Método B (Ver Materiales y Métodos Apartado. 3.5.2.1).

Picos: 1: Galactosa; 2: Glucosa; 3: β -D-Galp (1 \rightarrow 6)-D-Gal (galactobiosa); 4: β -D-Galp (1 \rightarrow 6)-D-Glc (alolactosa); 5: Lactosa; 6: β -D-Galp (1 \rightarrow 6)- β -D-Galp (1 \rightarrow 4)-D-Glcp (6'-galactosil- lactosa); 7: β -D-Galp (1 \rightarrow 3)-D-Glc; 8: β -D-Galp (1 \rightarrow 4)-D-Lac, 9: β -D-Galp (1 \rightarrow 3)-D-Lac *:Otros GOS (OGOS).

El análisis cualitativo de los carbohidratos presentes en la mezcla de síntesis se realizó utilizando los correspondientes patrones comerciales, así se identificaron la galactosa (pico 1), la glucosa (pico 2), la 6-galactobiosa (β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-D- β -Galp: pico 3) y la lactosa (pico 5). El pico 4 se identificó de manera tentativa como alolactosa (β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-Glc) al comparar su tiempo de retención relativo frente a la lactosa con el obtenido por Splechtna y col. (2006) quienes, empleando un método similar al nuestro, identificaron dicho compuesto

utilizando un patrón de alolactosa. En cuanto al pico 4 con tiempos de retención situados entre los mono- y disacáridos, podrían corresponder también a otros disacáridos, mientras que el pico 6, con un tiempo de retención superior al de la lactosa, podría ser asignado a un trisacárido. También se detectaron oligosacáridos con tiempos de retención superiores al de los trisacáridos.

Por ello, con objeto de llevar a cabo un análisis que permitiese completar la identificación de la mezcla de reacción, se empleó otro método empleado por Splechtna y col., 2006 (método B; Figura R27). Estos autores optimizaron dicho método para la separación de todos los OS presentes en la mezcla de reacción obtenidas de la hidrólisis de lactosa con β -galactosidasa de *Lactobacillus reuteri*. Aunque el método es largo y tiene lugar la co-elución de glucosa y galactosa, así como de la lactosa con otros disacáridos, permite la elución y detección de la mayor parte de los oligosacáridos formados. Los tiempos de retención relativos para todos los picos se calcularon respecto al de la lactosa y se compararon con los encontrados por Splechtna y col. (2006). Así, se pudieron identificar de manera tentativa los picos 6, 7 y 9 como la β -D-Galp(1 \rightarrow 6)-D-Lac (6'-galactosil lactosa), β -D-Galp(1 \rightarrow 3)-D-Glcp y la β -D-Galp(1 \rightarrow 3)-Lac (3'-galactosil-lactosa), respectivamente.

Por otro lado, el análisis de una mezcla comercial de GOS (VivinalGOS), cuyo oligosacárido mayoritario es la β -D-Galp(1 \rightarrow 4)-Lac (4'-galactosil-lactosa), permitió identificar este compuesto como el pico 8 en las mezclas de síntesis.

En resumen, se puede decir que los resultados obtenidos con la β -galactosidasa de *A. aculeatus* permitieron identificar como principal oligosacárido sintetizado la 6'-galactosil-lactosa, cuya formación ya había sido reportada por del Val y col. (2001), pero además, permitieron detectar por primera vez, otros GOS diferentes que no habían sido identificado con anterioridad.

Por lo que se refiere a los productos formados con la β -galactosidasa de *K. lactis*, Maugard y col. (2003) y Cheng y col. (2006) encontraron disacáridos en la mezcla de reacción de transgalactosilación utilizando la misma enzima pero no llegaron a identificarlos. Asimismo, Bridiau y col. (2006), en un estudio sobre la galactosilación de compuestos aromáticos, encontraron la 6'-galactosil-lactosa derivada de la acción de la misma enzima.

En ambos casos (*A. aculeatus* y *K. lactis*) el compuesto mayoritario fue el correspondiente al pico 6 (6'-galactosil-lactosa). Por esta razón, con objeto de confirmar su estructura, se realizó un fraccionamiento de la mezcla de reacción. Mediante el análisis por MS se mostró que el principal compuesto formado era un

trisacárido con una masa molecular de 504 uma. Asimismo, el análisis por RMN tanto de ^1H como de ^{13}C confirmó, por comparación de los desplazamientos químicos obtenidos (Tabla R5) con los de la bibliografía (Urashima y col., 1999, del Val y Otero, 2003) que la estructura correspondía a la 6'-galactosil lactosa ($\beta\text{-D-Galp}(1\rightarrow6)\text{-D-Lac}$) (Figura R28).

Tabla R5.- Desplazamientos químicos (ppm) correspondientes a los espectros de ^1H (500 MHz) y ^{13}C (125 MHz) de la 6'-galactosil-lactosa ($\beta\text{-D-Galp}(1\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-D-Galp}(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-D-Glcp}$) purificada mediante HPLC-RI a partir de las mezclas de reacción obtenidas durante la hidrólisis enzimática de la lactosa con las β -galactosidasas de *A. aculeatus* y *K. lactis*.

Posición	Desplazamientos químicos (ppm)	
Glucosa	^1H	^{13}C
1	4,71	96,70
2	3,55	75,00
3	3,64	75,69
4	4,65	80,49
5	4,63	76,13
6a	4,11	62,00
6b	3,85	
Galactosa $\beta(1\rightarrow4)$	^1H	^{13}C
1'	4,51	104,13
2'	3,61	71,79
3'	3,72	73,61
4'	4,00	69,63
5'	3,80	75,56
6'a	3,93	69,46
6'b	3,73	
Galactosa $\beta(1\rightarrow6)$	^1H	^{13}C
1''	4,52	104,35
2''	3,57	71,84
3''	3,70	74,74
4''	3,98	69,63
5''	3,74	76,13
6'' a/b	3,75-3,77	62,00

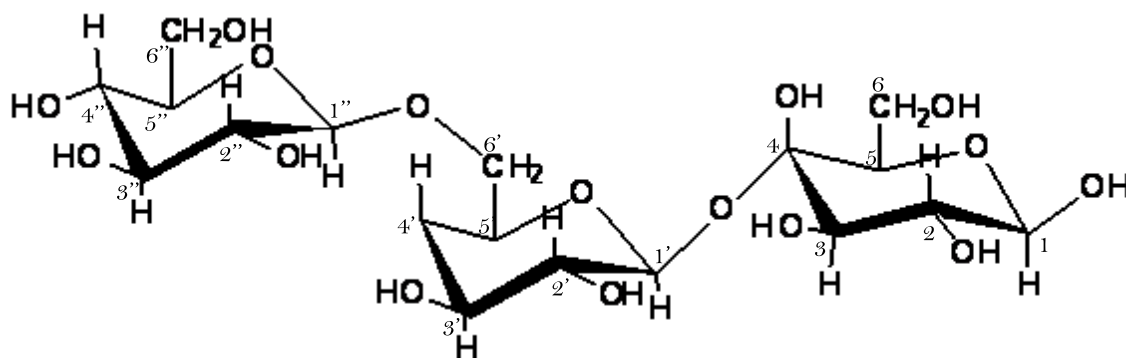


Figura R28.- Estructura del trisacárido 6'-galactosil-lactosa
(β -D-Galp(1 \rightarrow 6)- β -D-Galp(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp).

Los datos mostrados anteriormente concuerdan con resultados previos (Chockchaisawasdee y col., 2004) que indican que la reacción de transgalactosilación catalizada por la β -galactosidasa de *K. lactis* produce principalmente GOS con enlaces β (1 \rightarrow 6). Asimismo, los resultados obtenidos con la β -galactosidasa de *A. aculeatus* también produce mayoritariamente GOS con enlaces β (1 \rightarrow 6).

El hecho de que se empleen β -galactosidasas que den lugar a oligosacáridos con enlaces β (1 \rightarrow 6) es debida a que estos enlaces son más susceptibles frente a las β -galactosidasas de bifidobacterias que los β (1 \rightarrow 4) y los β (1 \rightarrow 3) (Rowland y Tanaka, 1993; Dumortier y col., 1994). Por ello, su utilización para la síntesis de oligosacáridos derivados de la lactulosa podría constituir un buen método para la obtención de nuevos compuestos con un gran potencial prebiótico.

Una vez identificados todos los compuestos que aparecían en las mezclas de síntesis se lactosa con β -galactosidasa de *A. aculeatus* ó *K. lactis*, se procedió a optimizar las condiciones de reacción con el fin de disponer de elevadas concentraciones de trisacáridos, a partir de los cuales, se formarían por isomerización los nuevos oligosacáridos derivados de la lactulosa. Así, las condiciones óptimas encontradas para ambas enzimas fueron: 450 g/L de lactulosa, pH 6,5, 60°C y 16 U/mL para la β -galactosidasa de *A. aculeatus*, y 250 g/L, pH 7.5, 40°C y 3 U/mL para la β -galactosidasa de *K. lactis*. En el primer caso el máximo rendimiento para los oligosacáridos formados se consiguió tras 7 horas de reacción, estando la mezcla compuesta, en estas condiciones, por un 16,85 % de 6'-galactosil-lactosa, un 2,75% de disacáridos (1,3% de alolactosa + 1,44% de 6'-galactobiosa), un 3,43% de OOS, un 52% de lactosa y un 24,97 % de monosacáridos. En el caso de la β -galactosidasa de *K. lactis* el mayor rendimiento

para los oligosacáridos se consiguió tras 2 horas de reacción. Para este tiempo, la mezcla de carbohidratos estaba compuesta por un 17% de 6'-galactosil-lactosa, un 13% de disacáridos (6% 6-galactobiosa+ 7% alolactosa), lactosa (21%) y un 49% de monosacáridos.

4.1.2.2. Isomerización de los GOS obtenidos

En medio básico, la lactosa se puede convertir en lactulosa, por isomerización de la glucosa en fructosa, con rendimientos del 70-80% usando catalizadores tales como el hidróxido de aluminio (Aider y de Halleux, 2007). Debido a que esta reacción de isomerización transforma los carbohidratos en forma de aldosa a cetosa, es posible desarrollar un proceso que permita modificar las propiedades de ciertos oligosacáridos prebióticos. Por lo tanto, las mezclas de GOS, obtenidas por transgalactosilación, se isomerizaron utilizando como catalizador aluminato sódico. Estos ensayos solo se realizaron con las mezclas obtenidas mediante β -galactosidasa de *K. lactis*, ya que el tiempo en alcanzar el máximo rendimiento en GOS fue menor (2 h frente a 7 h cuando la β -galactosidasa utilizada fue del *A. aculeatus*). En la Figura R29 pueden verse los perfiles obtenidos mediante el análisis por HPAEC-PAD de la mezcla de GOS utilizada para llevar a cabo la reacción de isomerización (A) y la mezcla resultante después del tratamiento con aluminato sódico (B). La identificación de los carbohidratos presentes en la mezcla de GOS se realizó previamente, tal y como se muestra en la figura R29 apareciendo en el cromatograma galactosa, glucosa, galactobiosa, alolactosa, lactosa, 4-galactobiosa y 6'-galactosil-lactosa. En la mezcla obtenida después de la isomerización se detectaron, además de los carbohidratos identificados de la mezcla de GOS, los isómeros correspondientes, es decir, tagatosa (pico 1'), fructosa (pico 2'), lactulosa (pico 5') y 6'-galactosil lactulosa (pico 7').

El espectro de masas de este nuevo compuesto (7') presente en la región de los trisacáridos dió lugar a una relación m/z de 527 correspondiente al ión $[\text{trisacárido} + \text{Na}]^+$. El análisis por RMN, para el espectro de ^1H , dió resultados coincidentes con los obtenidos anteriormente para el trisacárido 6'-galactosil-lactulosa obtenido por transgalactosilación durante la hidrólisis enzimática de lactulosa.

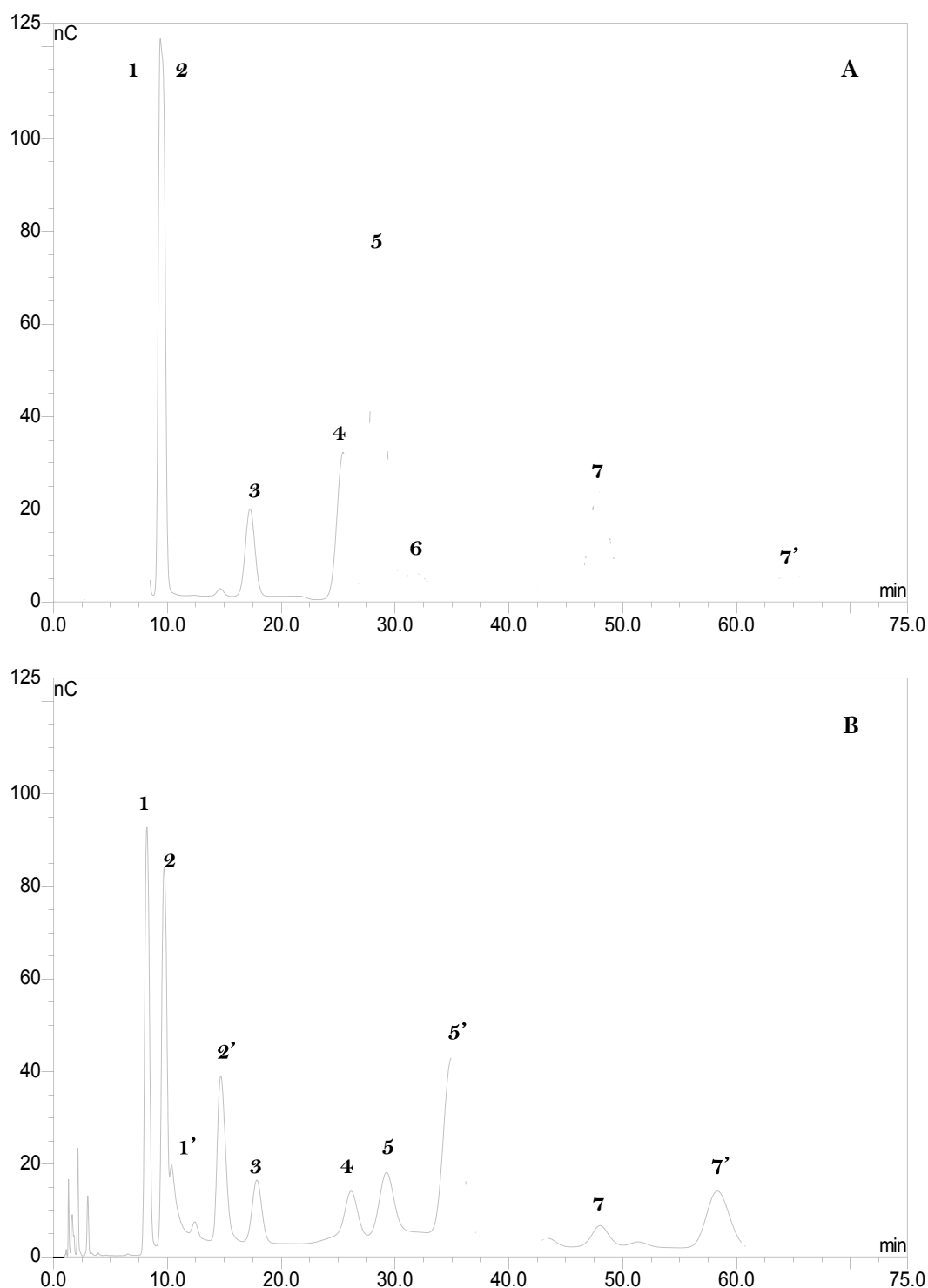
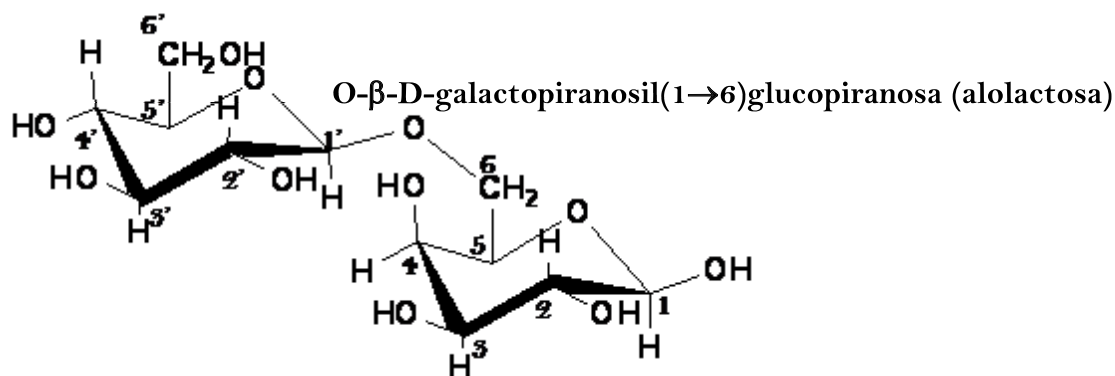


Figura R29.- Perfil obtenido por HPAEC-PAD de la mezcla de carbohidratos resultante de la hidrólisis enzimática de la lactosa con la β -galactosidasa de *K.lactis* antes (A) y tras 9h de isomerización a 40°C utilizando una relación molar aluminato/lactosa 3:1 (B). Picos: 1, galactosa; 2, glucosa; 3, 6-galactobiosa (β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-D-Galp); 4, alolactosa (β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-D-Glcp); 5, lactosa; 6, 4-galactobiosa (β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-D-Galp); 7, 6'-galactosil-lactosa (β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- β -D-Galp(1 \rightarrow 4)-D-Glcp); 1', tagatosa; 2', fructosa; 5', lactulosa; 7', 6'-galactosil-lactulosa(β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-D-Galp- (1 \rightarrow 4)-D-Fru).

Durante la isomerización de la mezcla de GOS no se detectó la formación de ningún compuesto nuevo en la zona de los disacáridos. Sin embargo, sí se observó una ligera disminución en el área de la 6-galactobiosa y un descenso mucho más pronunciado en el correspondiente al de la alolactosa (pico 4). Esto podría indicar que, aunque estos disacáridos se estén isomerizando, los correspondientes isómeros formados podrían coeluir con ellos, no siendo posible la separación mediante el método analítico empleado. Con objeto de comprobar este hecho, se procedió a isomerizar por separado la 6-galactobiosa (patrón comercial) y la alolactosa (previamente obtenida en el laboratorio, Apartado 3.3.2.2). En la tabla R6 y en la Figura R30 se muestran, respectivamente, los desplazamientos químicos para el espectro de RMN y las estructuras químicas de la alolactosa y su correspondiente isómero alolactulosa.

Tabla R6.- Desplazamientos químicos (ppm) para el espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz) para la alolactosa ($\beta\text{-D-Galp}(1\rightarrow6)\text{-D-Glcp}$) y la alolactulosa ($\beta\text{-D-Galp}(1\rightarrow6)\text{-D-Fruf}$).

Posición	Alolactosa ($\beta\text{-D-Galp}(1\rightarrow6)\text{-D-Glcp}$)	Alolactulosa ($\beta\text{-D-Galp}(1\rightarrow6)\text{-D-Fruf}$)
	Glucosa	Fructosa
1(α,β)	94,25; 98,07	62,7-62,6
2	73,58	101,8
3	76,16	71,8
4	70,7	74,8
5	74,8	79,3
6	71,59	70,1
	Galactosa $\beta(1\rightarrow6)$	Galactosa $\beta(1\rightarrow6)$
1'	103,75	103,44
2'	70,8	70,99
3'	74,97	72,77
4'	68,60	68,77
5'	77,29	75,28
6'	61,08	61,15



O-β-D-galactopiranosil-(1→6)-fructofuranosa (alolactulosa)

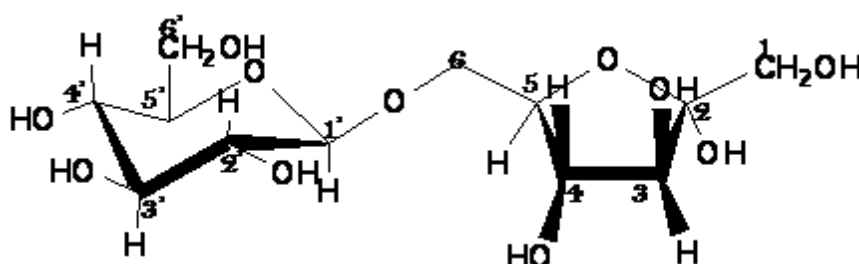


Figura R30.- Estructuras químicas para la alolactosa (O-β-D-galactopiranosil (1→6)-glucopiranososa) y la alolactulosa (O-β-D-galactopiranosil-(1→6)-fructofuranosa).

4.1.2.2.1. Optimización de la reacción de isomerización

Durante la producción de los GOS a partir de lactosa mediante la actividad transferasa de la β-galactosidasa de *K. lactis* también se forman cantidades significativas de glucosa y galactosa, permaneciendo una parte considerable de lactosa sin reaccionar. Como es sabido, estos carbohidratos no tienen propiedades prebióticas, puesto que son absorbidos en el intestino delgado incrementando por lo tanto el valor calórico del producto (Gibson y Roberfroid, 1995). Sin embargo, dado que la lactulosa y la tagatosa son reconocidos prebióticos (Mendez y Olano, 1979; Schumman, 2003; Bertelsen y col., 1999), la isomerización de la lactosa remanente y de la galactosa incrementaría así las propiedades prebióticas de la mezcla de oligosacáridos.

Puesto que la composición de la mezcla de carbohidratos tras la isomerización puede afectar a sus propiedades prebióticas, fue necesario llevar a cabo un estudio acerca de los factores que pueden incidir en una mayor proporción de carbohidratos prebióticos en dicha mezcla. Así, se ha estudiado también la influencia de varios parámetros tales como la temperatura, el tiempo y la concentración del catalizador básico (aluminato) en la isomerización.

Efecto de la relación aluminato/lactosa

Basándose en el trabajo de Zokaee y col., (2002) quién indicó que, utilizando una relación molar aluminato:lactosa 2:1, era posible alcanzar conversiones de lactosa a lactulosa de hasta un 70%, se han realizado diferentes ensayos utilizando además otras dos relaciones molares. La figura R31 muestra los cambios en la composición de la mezcla de carbohidratos durante 24 h de reacción.

El grado de desaparición de las aldosas (galactosa, glucosa, lactosa y 6'-galactosil-lactosa) aumentó con la cantidad de catalizador (Figura R31 a-d); sin embargo, el grado de formación de sus isómeros (Figura R31 e-h) fue diferente en función del tipo de carbohidrato. La formación de tagatosa (Figura R31 c) aumentó constantemente durante las 24 h de estudio a las 3 relaciones aluminato:lactosa estudiadas. Utilizando las relaciones aluminato:lactosa 4:1 y 3:1, la tagatosa alcanzó valores cercanos al 1,3 y al 1,5 %, respectivamente, mientras que sólo se consumió un 0,6 y un 0,8% de galactosa. Esto indica que parte de la tagatosa está siendo originada a partir de otros carbohidratos formados por unidades de galactosa. La cantidad máxima se consiguió con la mayor cantidad de catalizador y tras 24 h de reacción. La formación de fructosa (Figura R31d) fue mayor utilizando una relación aluminato:carbohidrato de 4:1 y 7 h de reacción; tras este período de tiempo comenzó su degradación. La formación máxima de lactulosa (Figura R31g) se alcanzó en las primeras 9 h de reacción, observándose ligeras diferencias a las tres concentraciones de catalizador empleadas. Tras alcanzar el máximo, la velocidad de degradación aumentó al aumentar la concentración de catalizador. Las velocidades de formación de la 6'-galactosil-lactulosa (Figura R31h) fueron similares para las relaciones aluminato lactosa 3/1 y 4/1, y, después de alcanzar la máxima formación a las 9 h de reacción, se observó una ligera degradación del compuesto con la relación molar 4/1. En función de estos resultados la relación aluminato/lactosa seleccionada fue 3/1.

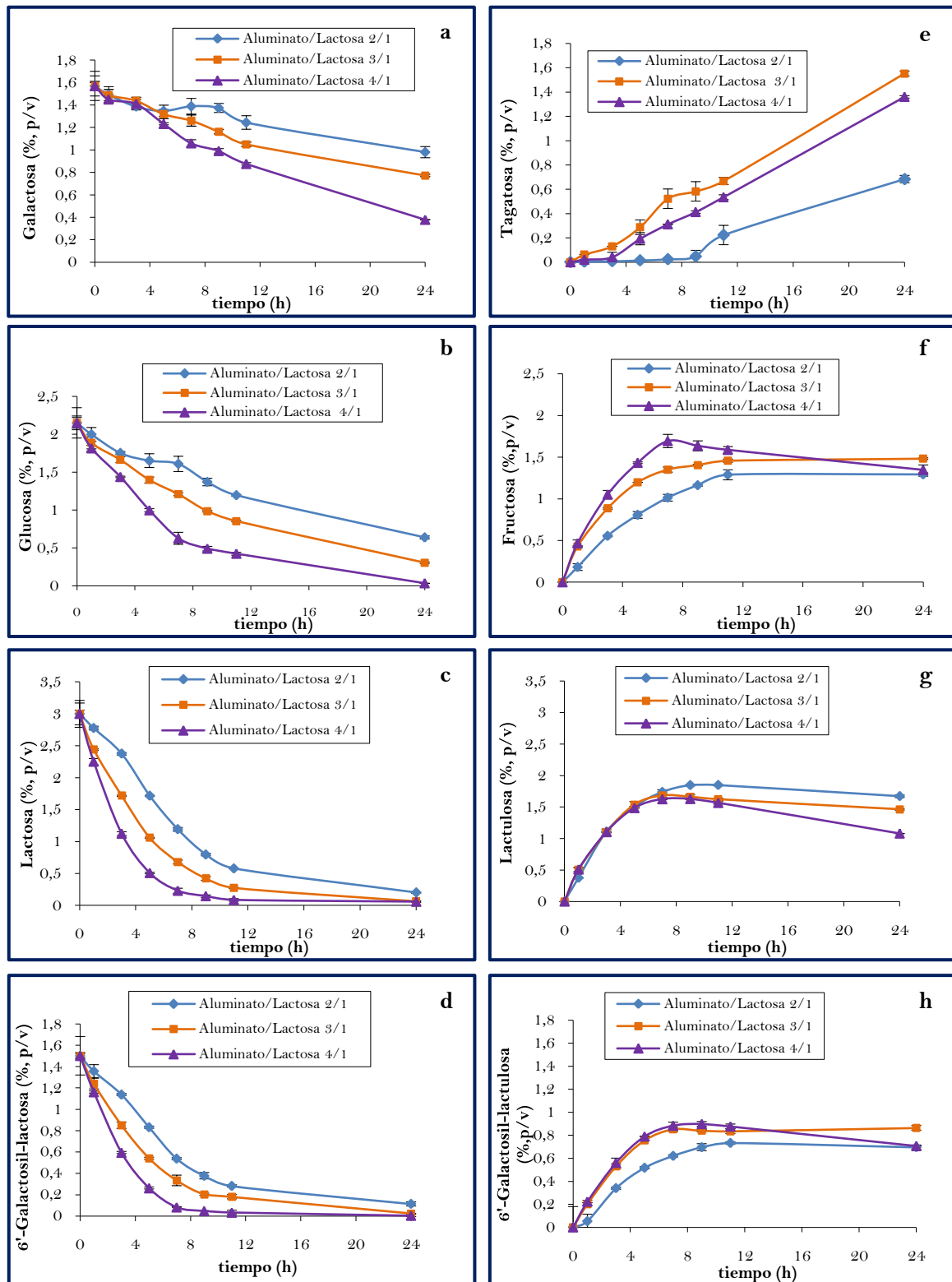


Figura R31.- Efecto de la concentración de aluminato en la isomerización de los GOS obtenidos mediante transgalactosilación de la lactosa con la β -galactosidasa de *K. lactis*.

Efecto de la temperatura

Para estudiar el efecto de la temperatura en la isomerización de los GOS, se llevaron a cabo diferentes ensayos a 35, 40, 45 y 50°C. Los resultados obtenidos (Figura R32), mostraron que la velocidad de desaparición de las aldosas (galactosa, glucosa, lactosa y 6'-galactosil-lactosa) (Figura R32a-d) se incrementó con la temperatura. Por otro lado, sin embargo, la velocidad de formación de las cetosas (tagatosa, fructosa, lactulosa y 6'-galactosil-lactulosa) (Figura R32 e-h) varió en función del carbohidrato. La formación máxima de tagatosa (R32e) y de fructosa (R32f) se observó a 40°C. La tagatosa aumentó constantemente durante las 24 horas estudiadas mientras que la formación de fructosa alcanzó el máximo a las 9 horas de reacción. La aplicación de temperaturas mayores causó una degradación considerable dando lugar a una disminución en el contenido en monosacáridos. La velocidad de formación de la lactulosa (Figura R32g) aumentó de 35 a 40°C, alcanzando niveles similares para ambas temperaturas pero a diferentes tiempos de reacción; a 35°C tuvo la máxima formación a las 9 horas de reacción mientras que a 40°C se produjo a las 7 horas. Temperaturas más elevadas causaron una disminución en el grado de formación de la lactulosa, probablemente debido a la degradación térmica. Respecto a la 6'-galactosil-lactulosa (Figura R32h), la máxima formación se alcanzó a 35 °C después de 24 horas de reacción y disminuyó conforme aumentó la temperatura.

De los resultados obtenidos se puede deducir que es posible obtener de forma sencilla oligosacáridos mediante isomerización en medio básico de una mezcla de carbohidratos obtenida por hidrólisis enzimática de la lactosa. La galactosa, la glucosa y la lactosa remanente se transformaron en tagatosa, fructosa y lactulosa, respectivamente. La alolactosa, la 6-galactobiosa y la 6'-galactosil-lactosa, principales GOS formados durante la hidrólisis enzimática de la lactosa, se isomerizaron en sus correspondientes cetosas. Las condiciones óptimas de reacción para obtener los mayores conversiones de lactosa y 6'-galactosil-lactosa fueron 40°C y 9 horas de reacción bajo un radio aluminato/lactosa 3/1. Bajo estas condiciones el rendimiento fue superior a un 60% y la cantidad final de carbohidratos se aproximó a un 90% del producto inicial. Además, este proceso disminuyó considerablemente las cantidades de lactosa, glucosa y galactosa, no recomendadas para gente con diabetes o con intolerancia a la lactosa.

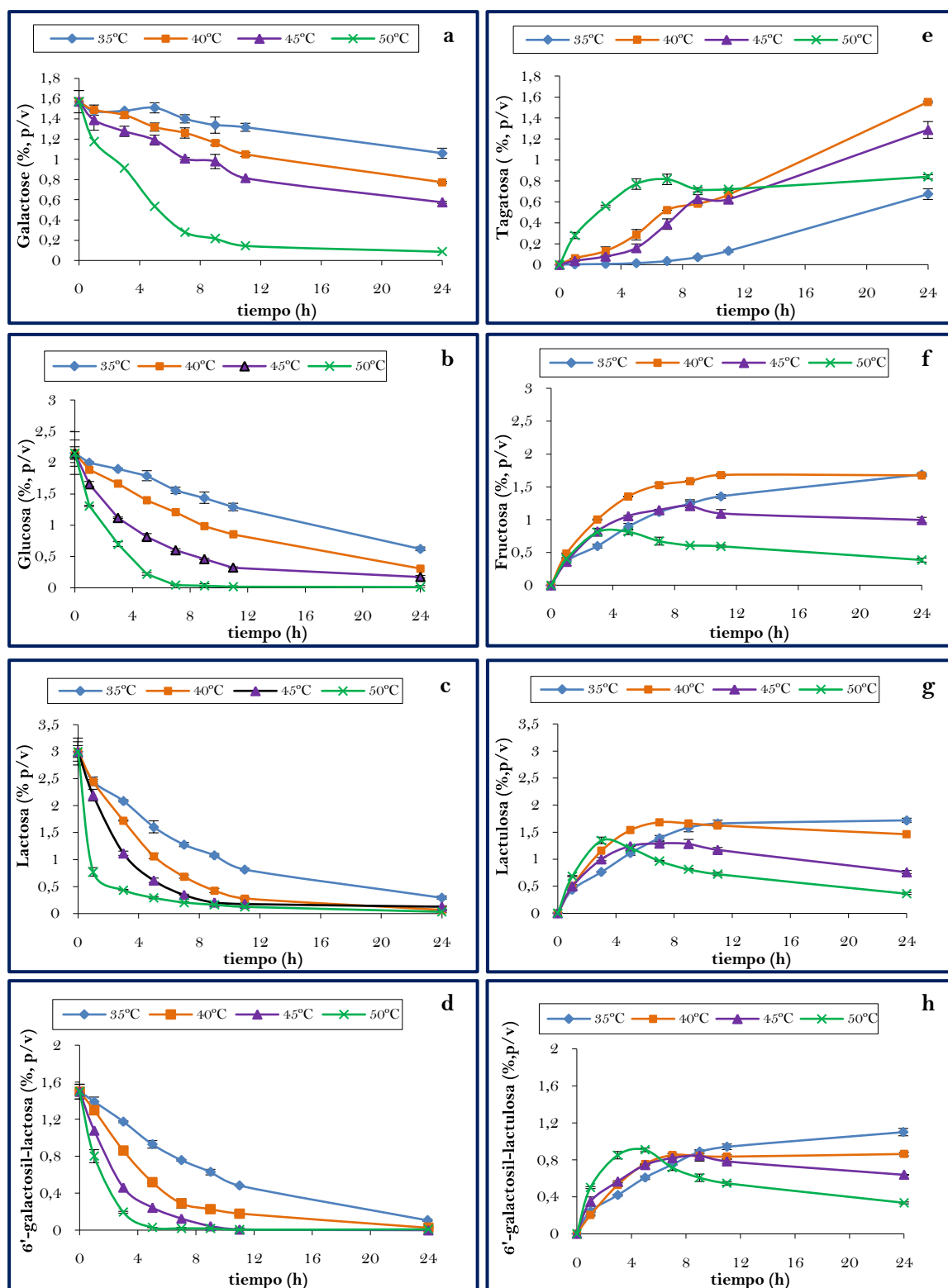


Figura R32.- Efecto de la temperatura en la isomerización de los GOS obtenidos por transgalactosilación a partir de lactosa utilizando una relación aluminato/lactosa 3/1.

4.1.3. Isomerización de la mezcla comercial de galactooligosacáridos VivinalGOS

Siguiendo en la búsqueda de nuevos carbohidratos con propiedades prebióticas, se realizó un estudio de optimización de la reacción de isomerización del ingrediente prebiótico comercial VivinalGOS.

4.1.3.1. Estudio de la composición en oligosacáridos

En primer lugar se estudió la composición de la mezcla de GOS. En la figura R33 puede observarse un cromatograma obtenido por HPAEC-PAD. El jarabe comercial estaba formado por un 25% de agua, un 41,6% de GOS, un 16,8% de lactosa, un 13,87% de glucosa y un 0,65% de lactosa. Sin embargo, nuestros propios análisis establecieron que la composición era de in 73,64% de GOS, un 10,20% de lactosa y un 16,1% de monosacáridos calculados en base al total de carbohidratos presentes en la mezcla de reacción.

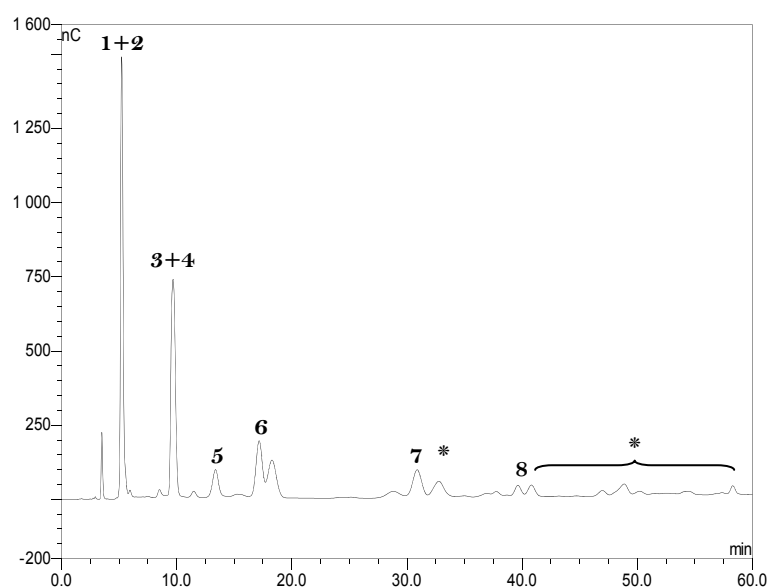


Figura R33.- Cromatograma obtenido por HPAEC-PAD de la mezcla comercial de oligosacáridos prebióticos Vivinal-GOS.

Picos: **1+2**: glucosa y galactosa; **3+4**: lactosa + alolactosa; **5**: 6'-galactosil-lactosa, **6**: 3-galactosil-glucosa; **7**: 4'-galactosil-lactosa; * Otros oligosacáridos.

Los datos encontrados en la bibliografía en lo referente a la composición de la mezcla de VivinalGOS obtenida por transgalactosilación de la lactosa mediante la β -galactosidasa del *B. circulans* son diversos. Así, Sinclair y col. (2009) dan

valores de un 59% (p/p) de GOS y un 41% de carbohidratos digeribles (constituidos por lactosa, glucosa y galactosa). Chockchaisawasdee y col., (2005) por otro lado, y basándose en los tipos de enlaces presentes en la mezcla, observaron que el VivinalGOS presentaba un alto porcentaje (55%) de compuestos con enlace $\beta(1\rightarrow4)$ Gal en la fracción de trisacáridos y del 72% en la fracción de los tetrasacáridos. En un trabajo reciente y mucho más detallado, Coulier y col., (2009) identificaron y cuantificaron todos los disacáridos presentes en la mezcla, así como los principales trisacáridos, utilizando una combinación de diferentes técnicas analíticas (HPAEC-PAD; HPAEC-MS, RMN). Los datos que se dan indican que la mezcla VivinalGOS está formada por un 67,9 % de GOS, un 10% de lactosa y un 22,5 de monosacáridos (21,2 % de glucosa y 1,3 % de galactosa), datos que se asemejan a nuestros resultados. Además, estos autores, aunque ya se conocía que la mezcla VivinalGOS presentaba di-, tri-, tetra- y pentasacáridos, indican que también el VivinalGOS presenta GOS de hasta DP10, aunque los GOS con DP5-10 sólo supongan un 5% del total de la mezcla. Considerando la fracción de trisacáridos y, de acuerdo con los resultados obtenidos por otros autores, y por nosotros, los que presentaron el enlace $\beta 1\rightarrow4$ entre galactosas fueron los mayoritarios.

Así, con objeto de profundizar un poco más en el estudio de trisacáridos con diferentes estructuras y enlaces, se procedió al aislamiento del compuesto mayoritario en esta fracción (pico 7, Figura R33) por HPLC-RI y se identificó por RMN. En la figura R34 y en la tabla R7 se muestran la estructura química y los desplazamientos químicos correspondientes al espectro de ^{13}C , respectivamente. La comparación del espectro con los datos de la bibliografía confirmó que se trataba del trisacárido 4'-galactosil-lactosa (Onishi y col., 1995).

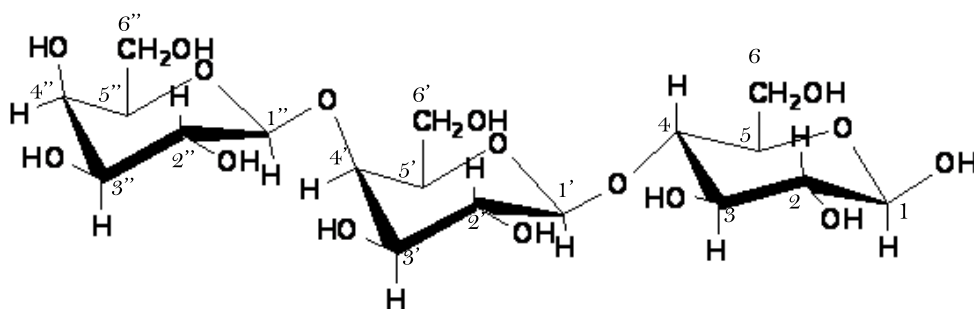


Figura R34.- Estructura química de la 4'-galactosil-lactosa
(β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp).

Tabla R7.- Desplazamientos químicos (ppm) obtenidos en el análisis por RMN de ^{13}C (125 MHz) del trisacárido aislado del VivinalGOS y los de la 4'-galactosil-lactosa reportados en la bibliografía (Onishi y col., 1995).

Posición	Desplazamientos químicos (ppm)	
Glucosa	Trisacárido aislado del producto comercial VivinalGOS	4'-galactosil-lactosa (Onishi y col., 1995)
1 α	91,870	92,69
1 β	95,816	96,64
2	73,832	74,67
3	74,421	75,25
4	78,296	79,23
5	74,558	75,38
6	59,914	60,79
Galactosa		
$\beta(1\rightarrow4)$		
1'	102,953	103,09
2'	71,163	72,00
3'	72,996	73,84
4'	77,190	78,06
5'	74,872	75,68
6'	60,806	61,62
Galactosa		
$\beta(1\rightarrow4)$		
1''	104,256	105,09
2''	71,415	72,25
3''	72,851	73,69
4''	78,661	69,50
5''	75,198	76,02
6''	61,058	61,87

4.1.3.2. Isomerización de la mezcla de GOS

Al igual que el resto de GOS, el VivinalGOS está formado por una serie de oligosacáridos con una glucosa terminal que puede isomerizarse a fructosa dando lugar a una generación de nuevos carbohidratos prebióticos. Por ello, en este apartado se describe un estudio sobre los cambios en la composición de carbohidratos de la mezcla VivinalGOS durante la isomerización química utilizando como catalizador aluminato sódico. En la Figura R35 se muestran los cromatogramas obtenidos análisis por HPLC-RI del VivinalGOS antes y después de la reacción de isomerización.

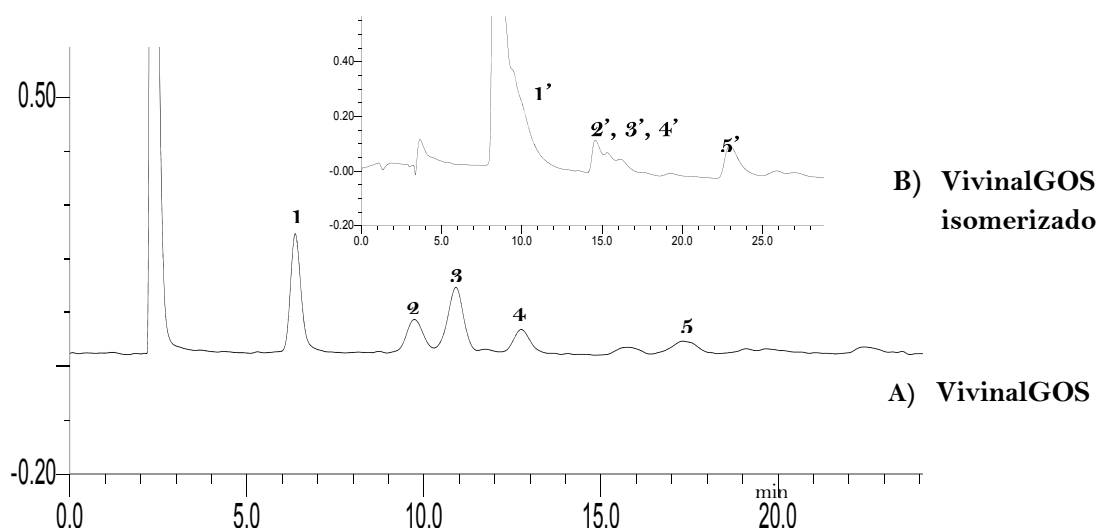


Figura R35.- Perfil cromatográfico obtenido por HPLC-RI de A) el producto comercial Vivinal GOS y B) el producto comercial VivinalGOS isomerizado en condiciones básicas con aluminato sódico. Relación aluminato: GOS (p/p)= 1,7; 1, 40° C y 9 horas de reacción.

Picos: **1**: monosacáridos; **2**: β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-D-Glcp (3-galactosil-glucosa), **3**: lactosa; **4**: β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-D-Glcp (alolactosa); **5**: β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-D-Glcp (4'-galactosil-lactosa); **1'**: monosacáridos; **2',3',4'**: disacáridos isomerizados; **5'**: β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-D-Galp-(1 \rightarrow 4)-D-Frup (4'-galactosil-lactulosa).

Como se observa el perfil cromatográfico cambió tras la isomerización, pudiendo procederse al aislamiento e identificación del nuevo trisacárido isomerizado de la 4'-galactosil-lactosa. Al igual que con los otros 2 trisacáridos derivados de la lactulosa se realizó un exhaustivo análisis por RMN para dilucidar su estructura. En la siguiente Figura R36 se muestra la estructura química del compuesto y en la Tabla R8 se indican los desplazamientos químicos obtenidos para el principal isómero de dicho compuesto en D₂O.

Tabla R8.- Desplazamientos químicos (ppm) obtenidos en los espectros de ^1H (500 MHz) y ^{13}C (125 MHz) y constantes de acoplamiento (Hz) del principal isómero del trisacárido formado durante la isomerización de la mezcla comercial VivinalGOS.

Posición	$\beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow4)\text{-D-Frup}$	Lactulosa	
	^1H	^{13}C	^1H ^{13}C
1 ^a	3,56	63,94	3,65 64,08
1b	3,38		3,49
2		98,18	98,26
3	3,74	66,13	3,84 66,23
4	3,94	77,44	4,06 77,59
5	4,03	66,74	4,13 66,97
6a	3,84	63,08	3,94 63,18
6b	3,58		3,68
1'	4,42, dd, 7.8	100,73	4,48 101,02
2'	3,50	71,24	3,53 70,95
3'	3,61	73,14	3,61 72,79
4'	4,01	77,23	3,85 68,88
5'	3,57	74,62	3,64 75,55
6'a	3,65	60,99	3,73 61,34
6'b			3,67
1''	4,43	104,29	
2''	3,40	71,41	
3''	3,48	72,84	
4''	3,73	68,70	
5''	3,51	75,23	
6''a/b	3,59	61,09	

*Los desplazamientos químicos señalados en color se corresponden con los carbonos anoméricos (en verde), cuaternarios (en lila) y protones anoméricos (en rojo) de cada uno de los compuestos identificados.

El espectro de ^{13}C del trisacárido 1 en D_2O dio lugar a tres conjuntos de señales indicando una mezcla de los isómeros mostrados en la Figura R36 (1A, 1B y 1C) debido al equilibrio mutarrotacional de la lactulosa entre sus formas piranosa y furanosa (Mayer y col., 2004).

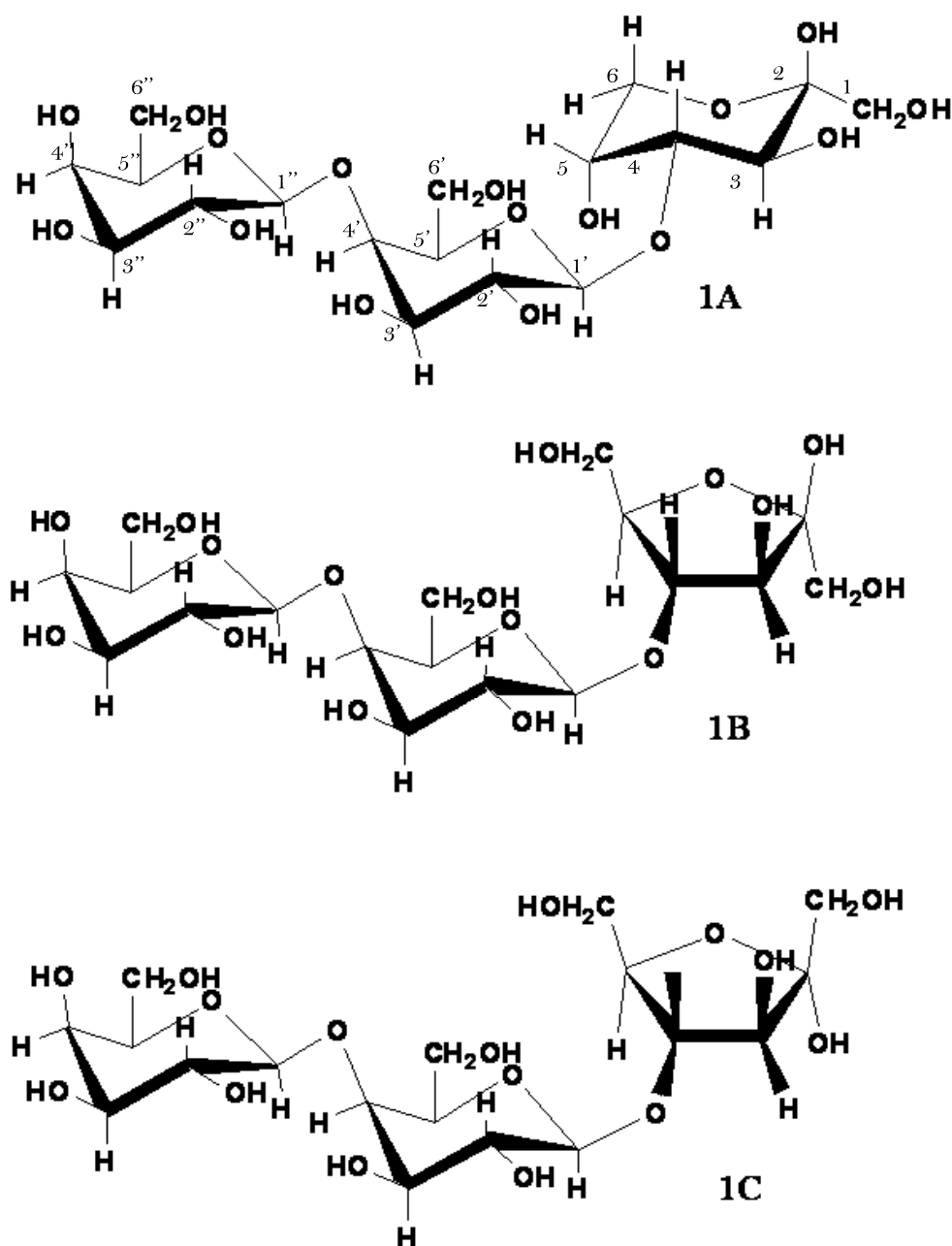


Figura R36.- Estructuras de los isómeros del trisacárido isomerizado
 (A) β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-fructopiranososa
 (B) β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-fructofuranosa
 (C) β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -D-fructofuranosa

El espectro de ^{13}C del trisacárido en D_2O dio lugar a tres conjuntos de señales pertenecientes a tres isómeros distintos (A, B y C) siendo el mayoritario la $\beta\text{-D-galactopiranosil-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-galactopiranosil-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-fructopiranosil}$. El conjunto de resonancias más importante se correspondió con el isómero más abundante (A), con dos carbonos anoméricos a δ 104,29 y 100,73 y un carbono cuaternario a δ 98,18. En consecuencia, el espectro de RMN de ^1H mostró señales para los dos protones anoméricos a δ 4,42 y 4,43.

La completa elucidación de las estructuras, al igual que en el caso de los trisacáridos sintetizados a partir de la lactulosa, se llevó a cabo no sólo mediante la realización de estudios unidimensionales (1D): ^1H , ^{13}C , TOCSY, sino también bidimensionales (2D): TOCSY, gHSQC, y gHMBC. Así, del análisis en dos dimensiones [^1H , ^1H] TOCSY, se identificaron dos sistemas siete espines. Además, también se encontraron dos sistemas adicionales de espín atribuibles a la mitad fructosa.

De los valores de las constantes de acoplamiento (datos no mostrados), se confirmó la existencia de dos unidades de β -galactosa. La posición de los enlaces glicosídicos se estableció mediante los espectros de gHMBC y ROESY. Además, las correlaciones por HMBC entre H-1' a δ 4,42 y C-4 a δ 77,44 (fructosa) y entre C-1' a δ 100,73 y H-4 (fructosa) a δ 3,94 permitieron establecer sin ninguna duda el enlace 1 \rightarrow 4 entre una unidad de galactosa y la de fructosa en la mitad lactulosa. Por otro lado, las correlaciones por HMBC entre H-1'' a δ 4,43 y C-4' a δ 77,23 y entre C-1'' a δ 104,29 y H-4' a δ 4,01, permitieron establecer el enlace 1 \rightarrow 4 entre las dos unidades galactosa.

4.2. MODELIZACIÓN DE LA FORMACIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS A PARTIR DE LACTULOSA POR TRANSGALACTOSILACIÓN.

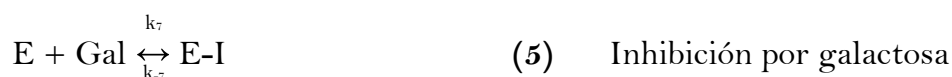
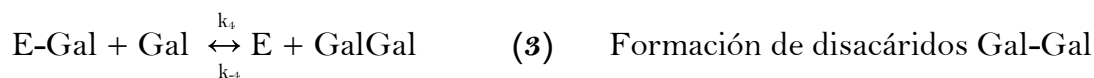
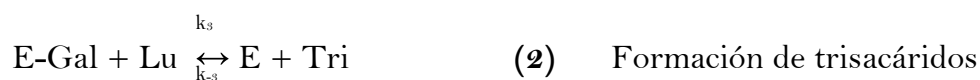
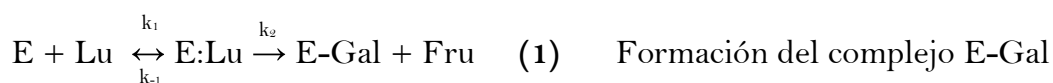
El presente estudio se ha focalizado en el desarrollo de un modelo cinético a partir de los resultados experimentales obtenidos para describir la síntesis de oligosacáridos derivados de la lactulosa con las β -galactosidasas *A. aculeatus* y *K. lactis* de las preparaciones enzimáticas comerciales Pectinex Ultra SP-L y Lactozym 3000 L HP G a varias concentraciones de sustrato y diferentes temperaturas (Apartado 4.1.1.2.1 y 4.1.1.1.2, respectivamente). Aunque hasta la fecha no existe en la literatura ningún estudio al respecto que explique el mecanismo de reacción, se ha supuesto que es el mismo que para los oligosacáridos derivados de la lactosa. Así, en el modelo planteado, la lactulosa (Lu) actúa tanto como sustrato y como aceptor, teniendo más probabilidades de

actuar como aceptor cuando se encuentra a elevadas concentraciones y formar así trisacáridos (Tri). La galactosa (Gal) se enlaza al enzima libre (E) dando lugar al complejo galactosil-enzima (E-Gal). La galactosa y la fructosa, por otro lado, también actúan como aceptores reaccionando con el complejo E-Gal para formar disacáridos del tipo galactosil-galactosa (GalGal) y galactosil-fructosa (GalFru). La síntesis de trisacáridos y disacáridos se ha planteado, además, como una reacción reversible puesto que una vez formados éstos también pueden hidrolizarse. Por lo que respecta a la reacción de inhibición, ésta también ha sido incluida en el planteamiento del modelo puesto que la formación de complejos monosacárido-enzima (EI) puede evitar el avance de la reacción de transgalactosilación. Otros mecanismos, como la mutarrotación de la galactosa y la producción de tetrasacáridos no se han tenido en cuenta para no aumentar el número de parámetros que podrían dificultar el ajuste del modelo.

Los resultados experimentales obtenidos con la β -galactosidasa de la preparación enzimática Pectinex Ultra SP-L, producida por *A. aculeatus* mostraron, dentro de los trisacáridos, la formación mayoritaria de la 6'-galactosil-lactulosa y, dentro de los disacáridos, de la 6-galactobiosa. Por ello, únicamente se tuvo en cuenta la reacción de formación de disacáridos en la que la galactosa actuase como aceptor. Además, los estudios de inhibición llevados a cabo, mostraron que únicamente la galactosa producía inhibición de tipo competitivo.

4.2.1. Modelo a temperatura constante

Así, en base al planteamiento teórico y a los datos experimentales se propuso el siguiente modelo para la β -galactosidasa de *A. aculeatus*:



Una vez planteadas las ecuaciones y antes de llevar a cabo el ajuste matemático, se verificó que los resultados experimentales cumplían el balance de materia con un error menor del 10%. Esto se comprobó a través de las siguientes ecuaciones para los residuos galactosa y fructosa:

$$\text{Residuo galactosa: } [Lu]_0 - [Lu] \approx [Gal] + 2[GalGal] + 2[Tri]$$

$$\text{Residuo fructosa: } [Lu]_0 - [Lu] \approx [Fru] + [Tri]$$

$$\text{Y el balance para la enzima: } [E] = [E]_0 - [EI] - [E:Lu] - [EGal]$$

donde $[Lu]_0$ es la concentración inicial de sustrato.

Las ecuaciones diferenciales resultantes fueron:

$$\frac{d[Lu]}{dt} = -k_1[Lu][E] - k_{-1}[E:Lu] - k_3[EGal][Lu] - k_{-3}[Tri][E]$$

$$\begin{aligned} \frac{d[Gal]}{dt} &= -k_4[EGal][Gal] - k_{-4}[GalGal][E] + k_6[EGal] - k_{-6}[Gal][E] - k_7[Gal][E] + k_{-7}[EI] \\ \frac{d[Fru]}{dt} &= k_2[E:Lu] \end{aligned}$$

$$\frac{d[Tri]}{dt} = k_3[EGal][Lu] - k_{-3}[Tri][E]$$

$$\frac{d[GalGal]}{dt} = k_4[EGal][Gal] - k_{-4}[GalGal][E]$$

$$\begin{aligned} \frac{d[E]}{dt} &= -k_1[Lu][E] - k_{-1}[E:Lu] + k_3[EGal][Lu] - k_{-3}[Tri][E] + k_4[EGal][Gal] \\ &\quad - k_{-4}[E][GalGal] + k_6[EGal] - k_{-6}[E][Gal] + k_7[E][Gal] - k_{-7}[EI] \end{aligned}$$

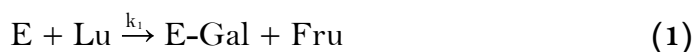
$$\frac{d[E:Lu]}{dt} = k_1[Lu][E] - k_{-1}[E:Lu]$$

$$\begin{aligned} \frac{d[EGal]}{dt} &= k_2[E:Lu] - k_3[EGal][Lu] + k_{-3}[Tri][E] - k_4[EGal][Gal] \\ &\quad + k_{-4}[E][GalGal] - k_6[EGal] + k_{-6}[E][Gal] \end{aligned}$$

$$\frac{d[EI]}{dt} = k_7[Gal][E] - k_{-7}[EI]$$

De esta manera, las ecuaciones planteadas se ajustaron a los datos experimentales obtenidos para dicha enzima a tres concentraciones iniciales de lactulosa diferentes (0,73 M, 1,3 M y 1,9 M) y a la misma temperatura (60 °C) con objeto de encontrar un único conjunto de parámetros que describa la síntesis de oligosacáridos a cualquier condición inicial de lactulosa dentro del rango considerado. Algunos estudios encontrados en la literatura (Chen y col., 2003) consideran la aproximación de estado estacionario para los complejos intermedios (en este trabajo E-Gal y E:Lu) por lo que en un primer momento se ha asumido que $d[E-Gal]/dt \approx 0$ y $d[E:Lu]/dt \approx 0$. El ajuste obtenido asumiendo estas consideraciones presenta algunas deficiencias, en particular para la predicción de las concentraciones de fructosa y galactosa, por lo que, a diferencia de otros autores, esta aproximación no se tuvo en cuenta. Además, los primeros resultados obtenidos sin la aproximación de estado estacionario, indicaron, en primer lugar, que el complejo E:Lu prácticamente no se forma en la mezcla de reacción en comparación con el complejo E-Gal. Por ello, se eliminó del mecanismo de reacción el complejo E:Lu y los parámetros correspondientes a las constantes de formación e hidrólisis del mismo (k_1 , k_{-1}).

La relevancia de la inhibición por galactosa no está clara en la literatura. Mientras autores como Bakken y col. (1992) y Mozaffar y col. (1984) defienden su importancia, otros estudios como el de Boon y col. (1999) la consideran despreciable en las condiciones de sus experimentos. Pese a que, a bajas concentraciones de lactulosa nuestros resultados experimentales han demostrado que existe inhibición por parte de la galactosa, en este caso se ha considerado el modelo sin inhibición como un submodelo del modelo con inhibición y hemos elegido el criterio de Akaike para ambos modelos a partir de los datos experimentales. A la vista de los resultados podemos decir que, el ajuste de los datos al modelo que incluye inhibición por parte de la galactosa, no es significativamente mejor que el modelo sin inhibición, por lo que la hemos eliminado del modelo. De esta manera, las reacciones se simplificaron de la siguiente manera:



La Figura R37 muestra la comparación entre los datos experimentales y los predichos a partir del mejor conjunto de parámetros estimados para la

concentración de los diferentes compuestos (lactulosa, fructosa, trisacáridos, galactosa y disacáridos galactosil-galactosa).

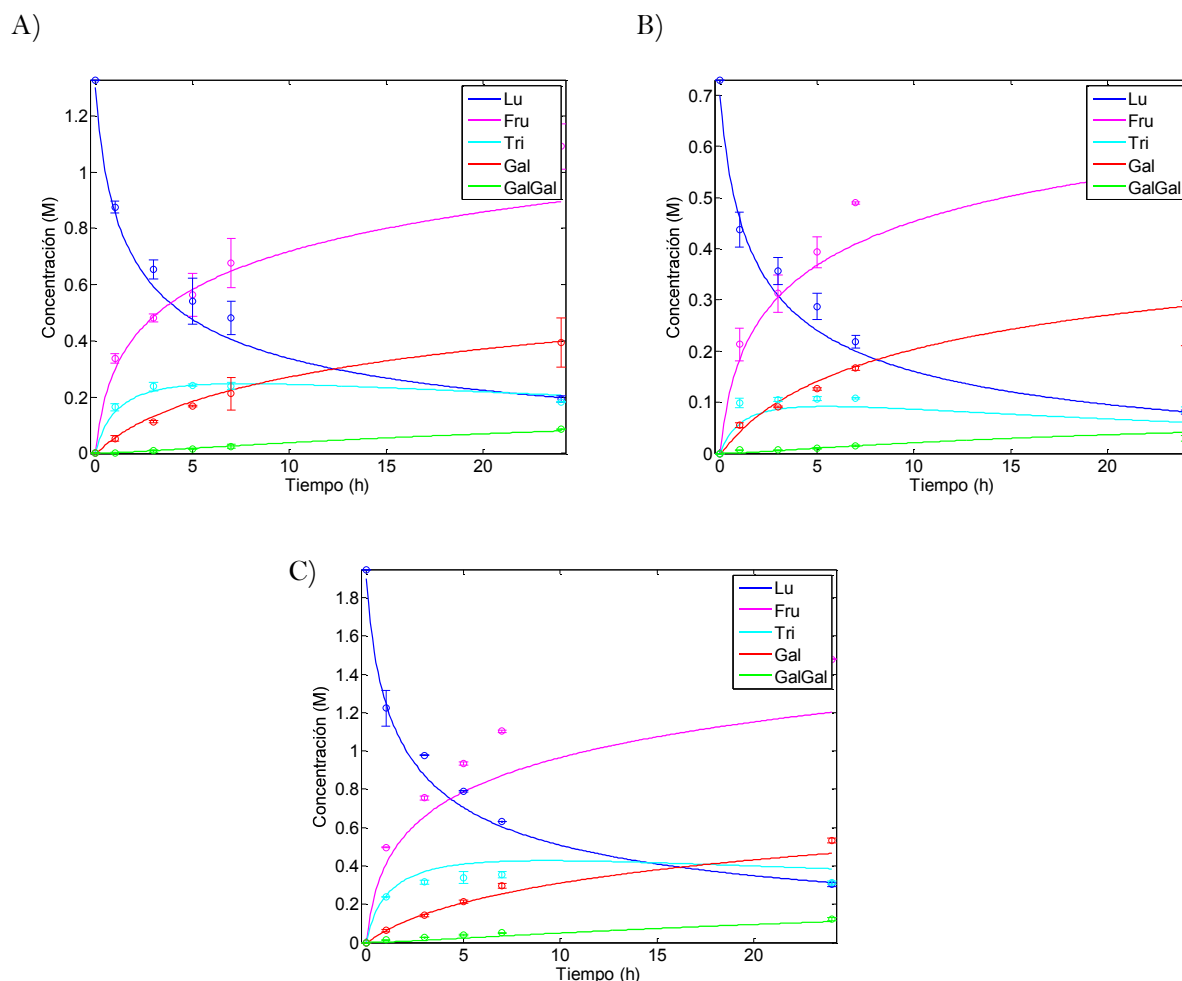


Figura R37.- Gráficas que representan las variaciones de concentración con el tiempo de los productos formados durante la hidrólisis de la lactulosa con la β -galactosidasa de Pectinex Ultra SP-L (*A. aculeatus*) a tres concentraciones diferentes de lactulosa iniciales (A) 1,3 M (B) 0,7 M y (C) 1,9 M a una temperatura de 60 °C. Los símbolos representan los datos experimentales y las líneas continuas, los valores predichos a partir del mejor ajuste obtenido sin la aproximación de estado estacionario.

Como puede observarse en la Figura R38, el análisis de sensibilidad muestra que el modelo es sensible a los 8 parámetros estimados, lográndose un buen ajuste entre los los diferentes datos experimentales llevados a cabo a diferentes concentraciones de lactulosa a la misma temperatura y los datos predichos; sin embargo los parámetros presentaron una gran correlación entre los diferentes coeficientes (k) (particularmente para las reacciones directas e inversas). Sin embargo, la matriz de correlación mostrada en la Figura R39 indicó que un gran correlación entre los coeficientes k_3 , k_4 y k_6 y sus correpondientes inversos (k_{-3} , k_{-4} y k_{-6} respectivamente). De esta manera, y para intentar minimizar estos problemas, lo

que se hizo fue establecer un valor nominal para las constantes de las reacción inversas (k_{-3} , k_{-4} y k_{-6}) dejando sólo las directas para la estimación. El ajuste obtenido de este modo, fue prácticamente el mismo (el valor de la función objetivo es sólo un 3% peor) pero se logra una importante mejora en la identificabilidad y los intervalos de confianza. El valor asignado a las constantes inversas es, en cierto modo, arbitrario por lo que en la tabla R9 aparece el valor de las constantes de equilibrio y sus intervalos de confianza para el mejor ajuste obtenido.

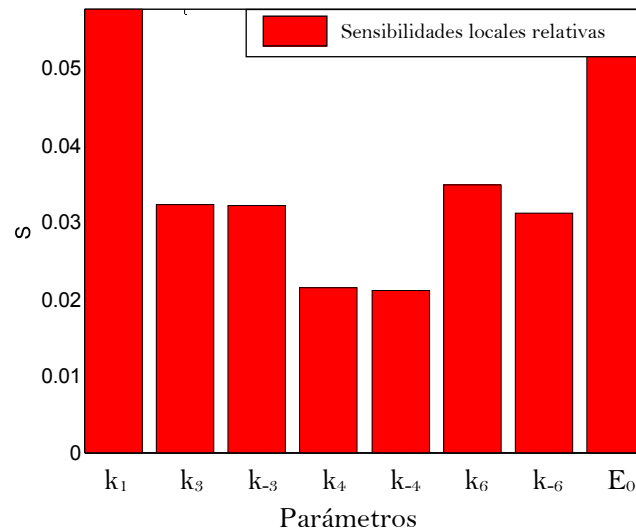


Figura R38.- Sesibilidad relativa local de los ocho parámetros implicados en el modelo que describe la hidrólisis y transgalactosilación de la lactulosa con la β -galactosidasa de *A. aculeatus* (Pectinex Ultra SP-L) a temperatura constante.

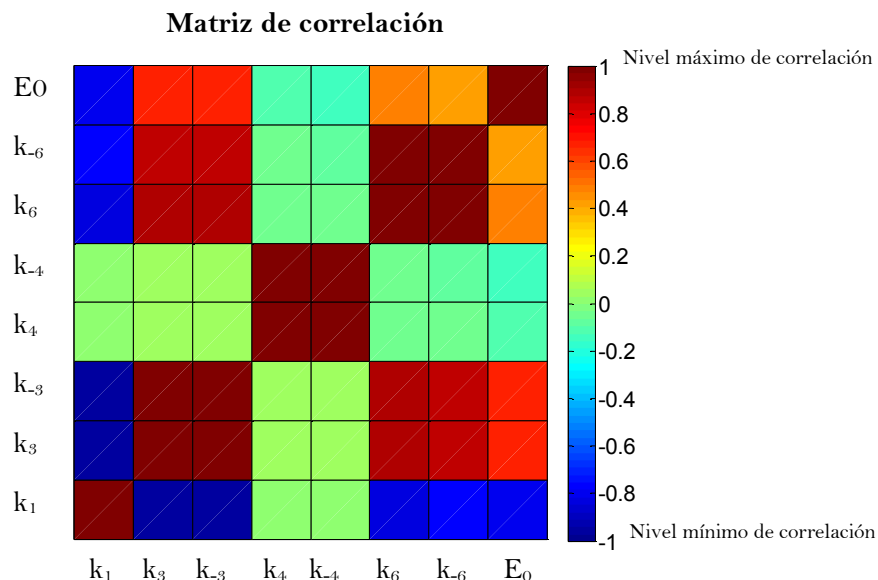


Figura R39.- Matriz de correlación para los ocho parámetros implicados en el modelo que describe la hidrólisis y transgalactosilación de la lactulosa con la β -galactosidasa de *A. aculeatus* (Pectinex Ultra SP-L) a temperatura constante.

Tabla R9.- Valores óptimos de los parámetros estimados para la hidrólisis de la lactulosa y la síntesis de oligosacáridos con la β -galactosidasa de *A. aculeatus* (Pectinex Ultra SP-L).

Resultados obtenidos con SSm	
Parámetro	Valores estimados <i>A. aculeatus</i> (Pectinex Ultra SP-L)
k_1	$3 \pm 7,8 \cdot 10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ h}^{-1}$
k_3	$8,8 \cdot 10^0 \pm 1,6 \cdot 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ h}^{-1}$
k_{-3}	$1,0 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ h}^{-1}$
k_4	$1,8 \cdot 10^0 \pm 3,4 \cdot 10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ h}^{-1}$
k_{-4}	$1,0 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ h}^{-1}$
k_6	$3,3 \cdot 10^0 \pm 6,3 \cdot 10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ h}^{-1}$
k_{-6}	$1,0 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ h}^{-1}$
E_0	$1,5 \cdot 10^{-1} \pm 1,5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$

Puesto que los resultados en el modelado de la síntesis de oligosacáridos derivados de la lactulosa con la β -galactosidasa de *A. aculeatus* fueron positivos puesto que se logró una buena correlación entre datos experimentales y predichos, se planteó la posibilidad de probar el ajuste con el mismo modelo para la β -galactosidasa de *K. lactis*, enzima de la que también poseíamos datos experimentales a diferentes concentraciones iniciales de lactulosa (0,73-1,95 M) y temperaturas (40 y 50°C). Además, como se ha visto anteriormente, los oligosacáridos formados diferían ligeramente de los hallados para la β -galactosidasa de *A. aculeatus*.

Así, los datos experimentales se reprodujeron utilizando el mismo modelo cinético y las mismas consideraciones (ausencia de inhibición a elevadas concentraciones de Lu, formación de disacáridos del tipo galactosil-galactosa,...). Así, se consideraron tres experimentos a la misma temperatura (50 °C) y distintas concentraciones iniciales de lactulosa (0,73 M, 1,33 M y 1,95 M). Con ambas enzimas (*A. aculeatus* y *K. lactis*), la producción de disacáridos es pequeña en relación a los trisacáridos y va aumentando con el tiempo de reacción. En el caso de la β -galactosidasa de *A. aculeatus* la producción de disacáridos muestra una tendencia cercana a la linealidad mientras que en el caso de la β -galactosidasa de *K. lactis* la producción parece no tener lugar (o al menos no es detectable) durante las primeras 4-6 horas de reacción presentando posteriormente grandes incrementos. Esta tendencia hace que el ajuste de los disacáridos sea muy difícil con el modelo planteado pero al mismo tiempo muestran una fuerte influencia sobre la función objetivo debido a la pequeña desviación estándar que presentaron estos valores. Puesto que este hecho podría provocar un mal ajuste de los

trisacáridos (de mayor interés para nosotros), se ha forzado a la función objetivo a que los datos experimentales correspondientes a los disacáridos tuviesen menos peso a la hora de realizar el ajuste.

Los análisis de sensibilidad (Figura R40) para el mayor conjunto de parámetros obtenidos de esta manera mostraron una menor sensibilidad del modelo hacia los parámetros de las reacciones inversas (k_{-3} , k_{-4} y k_{-6}) que hacia las directas y una mayor sensibilidad hacia la concentración inicial de enzima. Sin embargo, la matriz de correlación (Figura R41) mostró una correlación entre k_1 y las constantes de reacción inversas igual a 1, por lo que, al igual que en el caso de la modelización de la hidrólisis y transgalactosilación de la lactulosa con la β -galactosidasa de *A. aculeatus*, las constantes de las reacciones inversas (k_{-3} , k_{-4} y k_{-6}) se fijaron a un valor nominal.

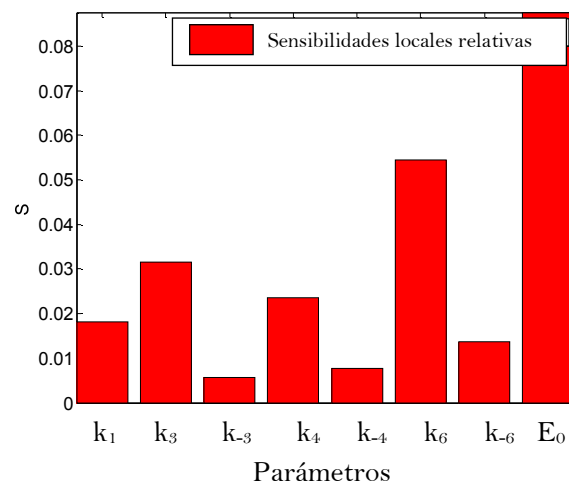


Figura R40.- Sesibilidad relativa local de los ocho parámetros implicados en el modelo que describe la hidrólisis y transgalactosilación de la lactulosa con la β -galactosidasa de *K. lactis* (Lactozym 3000L HP G) a temperatura constante.

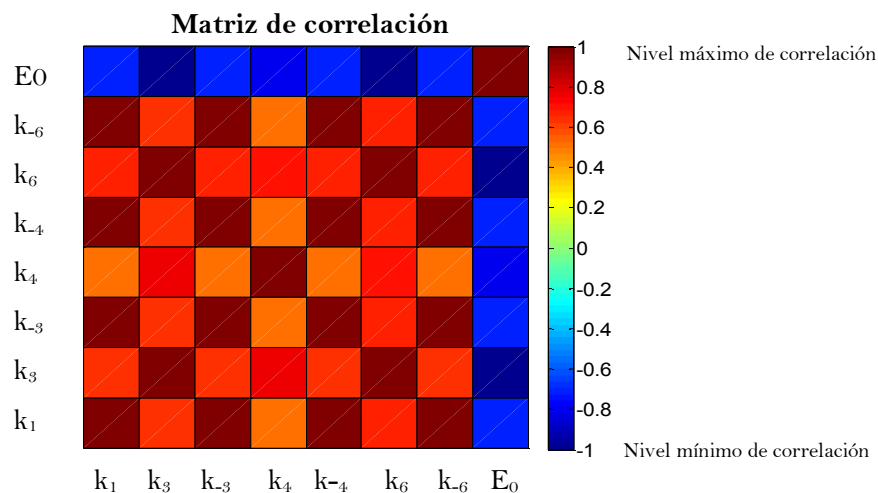


Figura R41.- Matriz de correlación para los ocho parámetros implicados en el modelo que describe la hidrólisis y transgalactosilación de la lactulosa con la β -galactosidasa de *K. lactis* (Lactozym 3000L HP G) a temperatura constante.

El valor del mayor conjunto de parámetros y sus intervalos de confianza se muestran en la tabla R10.

Tabla R10.- Valores óptimos de los parámetros estimados para la hidrólisis de la lactulosa y la síntesis de oligosacáridos con la β -galactosidasa de *K. lactis* (Lactozym 3000L HP G).

Resultados obtenidos con SSm	
Parameter	Valores estimados
	<i>K. lactis</i> (Lactozym 3000L HP G)
k_1	$2,2 \cdot 10^2 \pm 5,9 \cdot 10^1 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$
k_3	$3,4 \cdot 10^{-1} \pm 8,4 \cdot 10^{-2} \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$
k_{-3}	$1,0 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$
k_4	$2,9 \cdot 10^{-1} \pm 7,7 \cdot 10^{-2} \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$
k_{-4}	$1,0 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$
k_6	$4,4 \cdot 10^{-1} \pm 1,0 \cdot 10^{-1} \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$
k_{-6}	$1,0 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$
E_0	$1,0 \cdot 10^{-1} \pm 1,9 \cdot 10^{-2} \text{ M}$

El valor hallado para k_1 resultó, tal y como era de esperar, ser mayor que el encontrado para el caso de la β -galactosidasa de *A. aculeatus* ya que la disminución en la concentración de lactulosa y el incremento en la de fructosa es más rápido para la β -galactosidasa de *K. lactis*. Por otro lado, el valor encontrado para k_3 fue más pequeño en el caso de la β -galactosidasa de *K. lactis*, lo que explica el hecho de que la formación de trisacáridos sea menor y la reacción más lenta.

En la Figura R42 aparecen los valores simulados, representados con líneas continuas, y los valores experimentales vienen dados con símbolos. Como puede observarse, también se obtuvieron buenos resultados para el ajuste con esta enzima.

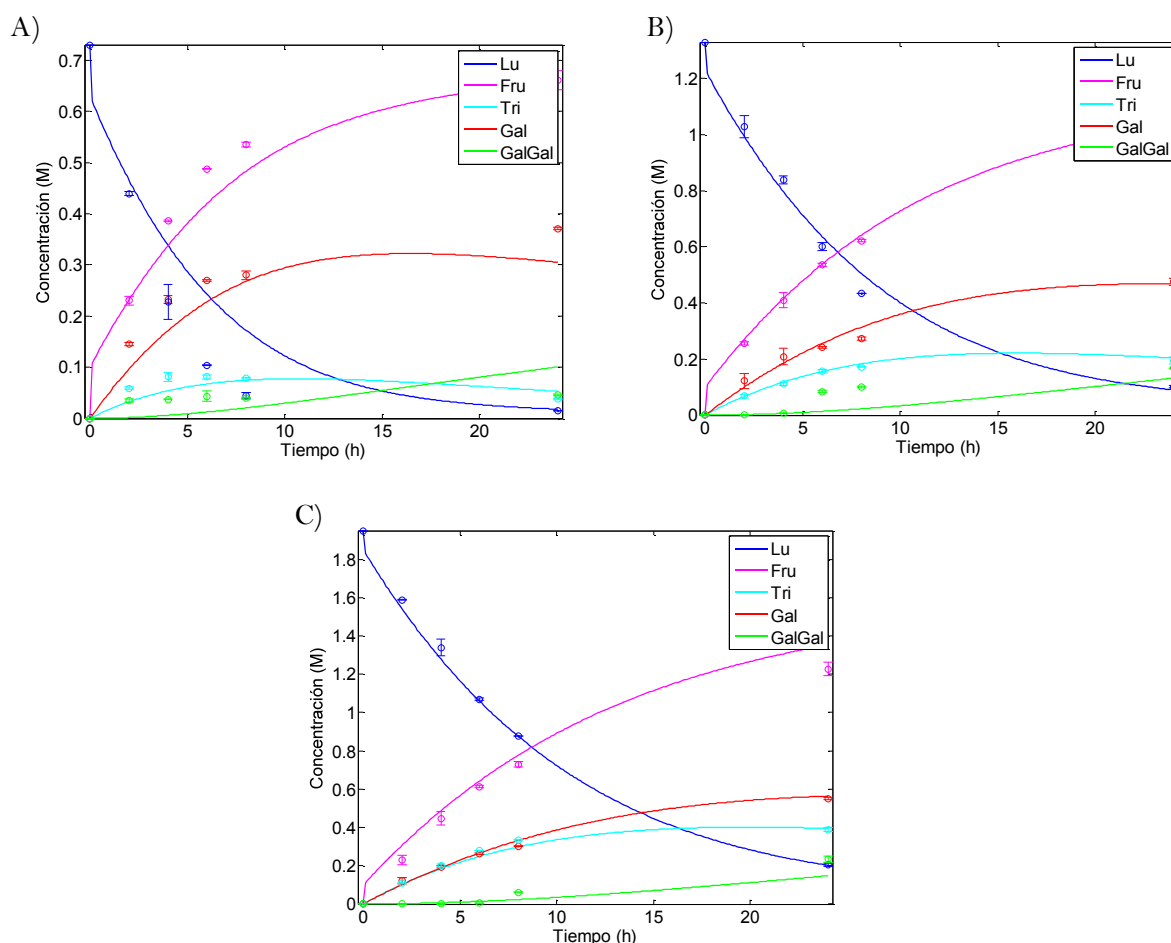


Figura R42.- Gráficas que representan las variaciones de concentración con el tiempo de los productos formados durante la hidrólisis de la lactulosa con la β -galactosidasa de *K. lactis* a tres concentraciones diferentes de lactulosa (A) 0,73 M (B) 1,33 M y (C) 1,95 a una temperatura de 50°C. Los símbolos representan los datos experimentales y las líneas continuas, los valores predichos a partir del mejor ajuste obtenido sin la aproximación de estado estacionario.

4.2.2. Modelo dependiente de la temperatura

Una vez obtenido un buen ajuste para los experimentos llevados a cabo con ambas β -galactosidas a diferentes concentraciones de lactulosa a la misma temperatura, se incluyó en el modelo la dependencia con la temperatura mediante la ecuación de Arrhenius:

$$k = k_0 e^{-E_a/RT}$$

donde E_a es la energía de activación (J/mol), k_0 el factor pre-exponencial, R la constante de los gases ideales (8,3 J/mol K) y T la temperatura (K).

Dicha expresión, para las reacciones directas e inversas se incluyó en el modelo tal y como se muestra a continuación (ver Tabla R11 para el modelo completo):

Formación de trisacáridos : $k_3 = K_{03} e^{-E_{a3}/RT}$

Hidrólisis de trisacáridos: $k_{-3} = K_{03i} e^{-E_{a3i}/RT}$

Tabla R11.- Expresiones obtenidas para las ecuaciones de variación de concentración con el tiempo para lactulosa, fructosa, galactosa, disacáridos del tipo GalGal, trisacáridos y complejo enzima-galactosa.

Carbohidrato	Expresiones de velocidad
Lactulosa	$d[Lu]/dt = -(k_{01} \exp(-E_{a1}/(R \cdot T))) \cdot [Lu] \cdot [E_0] +$ $(k_{01} \exp(-E_{a1}/(R \cdot T))) \cdot [Lu] \cdot [EGal] -$ $(k_{03} \exp(-E_{a3}/(R \cdot T))) \cdot [EGal] \cdot [Lu] +$ $(k_{03i} \exp(-E_{a3i}/(R \cdot T))) \cdot [Tri] \cdot [E_0] -$ $(k_{03i} \exp(-E_{a3i}/(R \cdot T))) \cdot [Tri] \cdot [EGal]$
Fructosa	$d[Fru]/dt = -(k_{01} \exp(-E_{a1}/(R \cdot T))) \cdot (-[E_0] + [EGal]) \cdot [Lu]$
Galactosa	$d[Gal]/dt = -(k_{04} \exp(-E_{a4}/(R \cdot T))) \cdot [EGal] \cdot [Gal] +$ $(k_{04i} \exp(-E_{a4i}/(R \cdot T))) \cdot [GalGal] \cdot [E_0] -$ $(k_{04i} \exp(-E_{a4i}/(R \cdot T))) \cdot [GalGal] \cdot [EGal] +$ $(k_{06} \exp(-E_{a6}/(R \cdot T))) \cdot [EGal] -$ $(k_{06i} \exp(-E_{a6i}/(R \cdot T))) \cdot [Gal] \cdot [E_0] +$ $(k_{06i} \exp(-E_{a6i}/(R \cdot T))) \cdot [Gal] \cdot [EGal]$
Disacáridos	$d[GalGal]/dt = (k_{04} \exp(-E_{a4}/(R \cdot T))) \cdot [EGal] \cdot [Gal] -$ $(k_{04i} \exp(-E_{a4i}/(R \cdot T))) \cdot [GalGal] \cdot [E_0] +$ $(k_{04i} \exp(-E_{a4i}/(R \cdot T))) \cdot [GalGal] \cdot [EGal]$
Trisacáridos	$d[Tri]/dt = (k_{03} \exp(-E_{a3}/(R \cdot T))) \cdot [EGal] \cdot [Lu] -$ $(k_{03i} \exp(-E_{a3i}/(R \cdot T))) \cdot [Tri] \cdot [E_0] +$ $(k_{03i} \exp(-E_{a3i}/(R \cdot T))) \cdot [Tri] \cdot [EGal]$
Complejo Enzima-Galactosa	$d[EGal]/dt = (k_{01} \exp(-E_{a1}/(R \cdot T))) \cdot [Lu] \cdot [E_0] -$ $(k_{01} \exp(-E_{a1}/(R \cdot T))) \cdot [Lu] \cdot [EGal] -$ $(k_{03} \exp(-E_{a3}/(R \cdot T))) \cdot [EGal] \cdot Lu +$ $(k_{03i} \exp(-E_{a3i}/(R \cdot T))) \cdot [Tri] \cdot [E_0] -$ $(k_{03i} \exp(-E_{a3i}/(R \cdot T))) \cdot [Tri] \cdot [EGal] -$ $(k_{04} \exp(-E_{a4}/(R \cdot T))) \cdot [EGal] \cdot [Gal] +$ $(k_{04i} \exp(-E_{a4i}/(R \cdot T))) \cdot [GalGal] \cdot [E_0] -$ $(k_{04i} \exp(-E_{a4i}/(R \cdot T))) \cdot [GalGal] \cdot [EGal] -$ $(k_{06} \exp(-E_{a6}/(R \cdot T))) \cdot EGal +$ $(k_{06i} \exp(-E_{a6i}/(R \cdot T))) \cdot Gal \cdot E_0 -$ $(k_{06i} \exp(-E_{a6i}/(R \cdot T))) \cdot Gal \cdot EGal$

Estimación de los parámetros

Las expresiones de las velocidades de reacción para el modelo propuesto, se ajustaron simultáneamente a los cinco experimentos de diferente concentración inicial de lactulosa (0.73 M, 1.33 M y 1.95 M) y temperatura (313, 323 y 333 K). Se utilizó la misma concentración de enzima para todos los experimentos. El valor de pH también se mantuvo constante. La Figura R43 muestra los datos experimentales y la predicción del modelo para los diferentes experimentos.

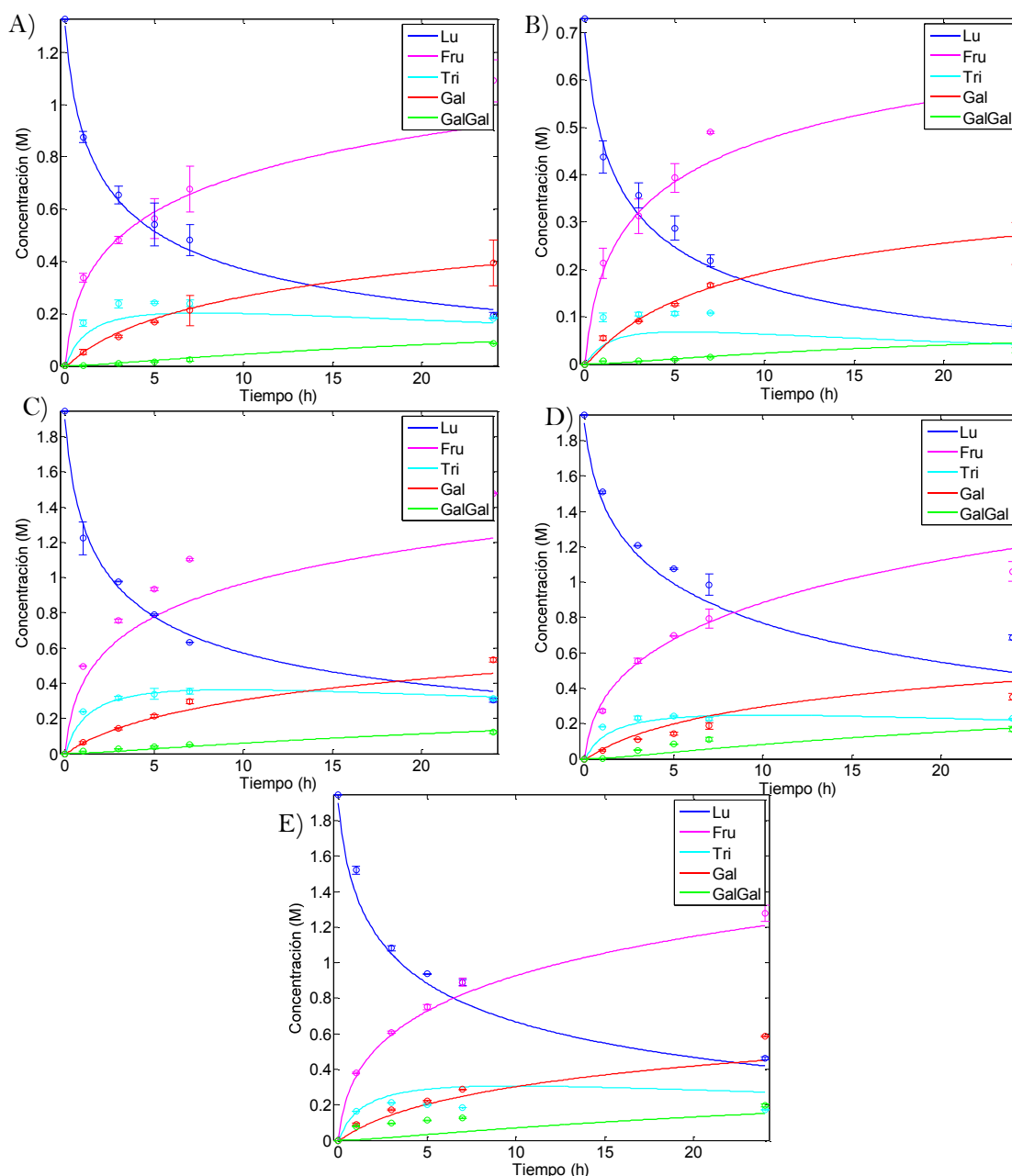


Figura R43.- Gráficas que representan las variaciones de concentración con el tiempo de los productos formados durante la hidrólisis de la lactulosa con la β -galactosidasa de Pectinex Ultra SP-L (*A. aculeatus*) a tres concentraciones iniciales de lactulosa diferentes (A), (B) y (C) y diferentes temperaturas (C), (D) y (E). Los símbolos representan los datos experimentales y las líneas continuas, el ajuste con el modelo propuesto.

Cada experimento describió las variaciones de concentración con el tiempo para la lactulosa, fructosa, galactosa, trisacáridos y disacáridos. Como puede observarse los valores experimentales y los simulados se aproximaron bastante, lo que indica una buena elección del modelo. Los valores numéricos obtenidos, para el mejor ajuste obtenido se muestran en la tabla R12.

Se ha procedido de manera análoga para el caso de la enzima β -galactosidasa de *K. lactis*, de la cual disponemos datos de cuatro experimentos a diferentes concentraciones iniciales de lactulosa (0,73 M, 1,33 M y 1,95 M) y temperaturas (40 y 50°C). En la Figura R44 puede observarse que el ajuste del modelo dependiente de la temperatura a los datos experimentales disponibles es bueno.

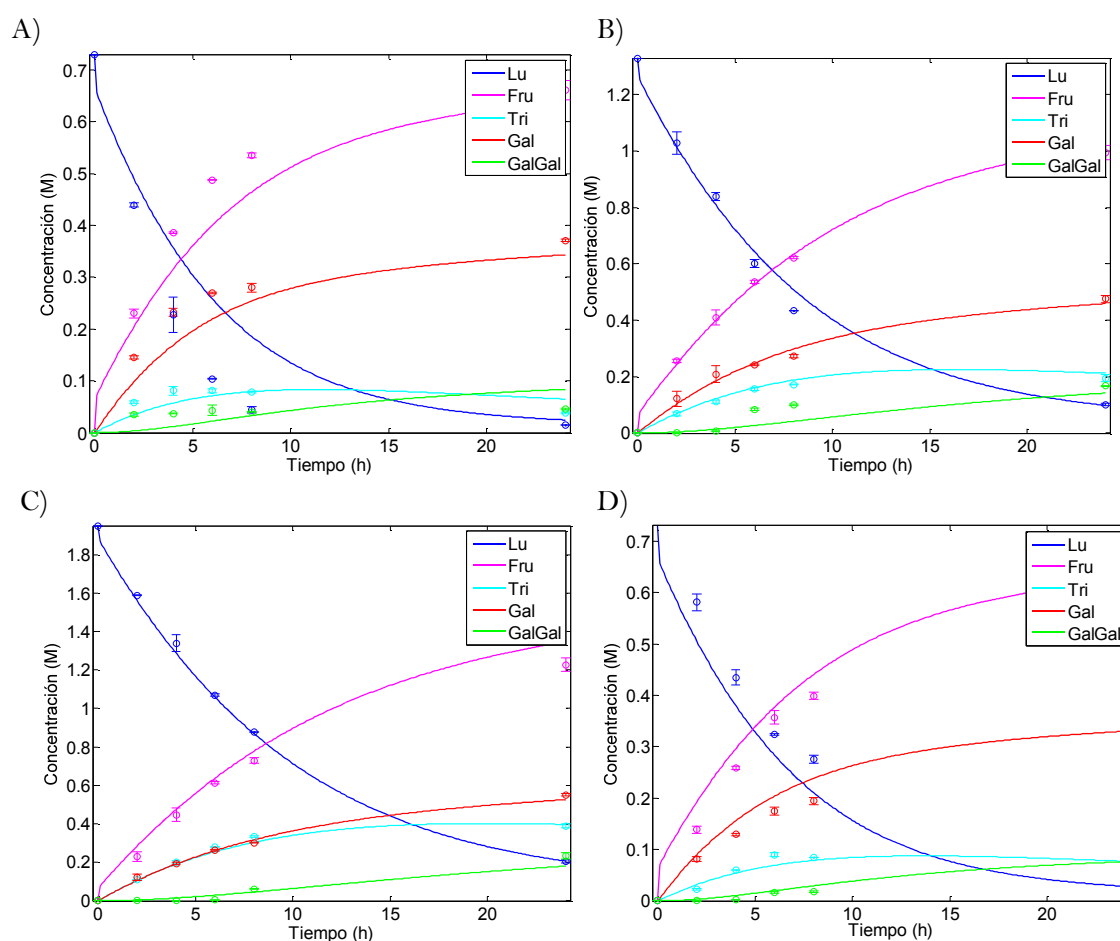


Figura R44.- Gráficas que representan las variaciones de concentración con el tiempo de los productos formados durante la hidrólisis de la lactulosa con la β -galactosidasa de *K. lactis* a tres concentraciones iniciales de lactulosa diferentes (A), (B) y (D) y diferentes temperaturas (A) y (D). Los símbolos representan los datos experimentales y las líneas continuas el ajuste con el modelo propuesto.

En la tabla R12 pueden encontrarse los valores de los parámetros para el mejor ajuste con las dos enzimas empleadas en este trabajo. Nótese, que las correlaciones encontradas entre los distintos parámetros, especialmente entre las constantes preexponenciales y sus correspondientes energías de activación para las expresiones de Arrhenius son muy elevadas por lo que no se puede afirmar que estos conjuntos de parámetros sean los únicos que proporcionen un buen ajuste a los datos experimentales. Esto se debe en primer lugar a las complicaciones intrínsecas a la propia estructura de la expresión de Arrhenius ya reportadas por otros autores como Pritchard y Bacon (1978) y por otra parte a la escasez de datos experimentales (para la enzima β -galactosidasa de *K. lactis* sólo disponemos datos a dos temperaturas diferentes y con una diferencia de sólo 10°C por lo que la identificación resulta complicada).

Tabla R12.- Valores óptimos de los parámetros estimados para la hidrólisis de la lactulosa y la síntesis de oligosacáridos con las β -galactosidasas de *Aspergillus aculeatus* (Pectinex Ultra SP-L) y *Kluyveromyces lactis* (Lactozym 3000L HP G).

Resultados obtenidos con SSm		
Parameter	Valores estimados	Valores estimados
	<i>A. aculeatus</i> (Pectinex Ultra SP-L)	<i>K. lactis</i> (Lactozym 3000L HP G)
K_{01}	$3,8 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$	$4,8 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$
K_{03}	$1,9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$	$1,4 \cdot 10^1 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$
K_{-03i}	$1,5 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$	$1,1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$
K_{04}	$3,2 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$	$2,6 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$
K_{-04}	$5,3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$	$1,2 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$
K_{06}	$1,9 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$	$2,1 \cdot 10^1 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$
K_{-06}	$1,1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$	$1,4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$
E_{a1}	$1,3 \cdot 10^4 \text{ J/M}$	$9,7 \cdot 10^3 \text{ J/M}$
E_{a3}	$2,2 \cdot 10^4 \text{ J/M}$	$9,0 \cdot 10^3 \text{ J/M}$
E_{a3i}	$1,0 \cdot 10^3 \text{ J/M}$	$2,8 \cdot 10^4 \text{ J/M}$
E_{a4}	$1,0 \cdot 10^3 \text{ J/M}$	$4,1 \cdot 10^3 \text{ J/M}$
E_{a4i}	$2,3 \cdot 10^4 \text{ J/M}$	$3,0 \cdot 10^2 \text{ J/M}$
E_{a6}	$1,4 \cdot 10^4 \text{ J/M}$	$8,4 \cdot 10^3 \text{ J/M}$
E_{a6i}	$2,2 \cdot 10^4 \text{ J/M}$	$6,4 \cdot 10^3 \text{ J/M}$
E_0	$2,0 \cdot 10^{-1} \text{ M}$	$6,6 \cdot 10^{-2} \text{ M}$

La Tabla R13 muestra las constantes de reacción calculadas para los mejores parámetros obtenidos según el modelo propuesto a una temperatura fija. Las temperaturas seleccionadas para el cálculo de las constantes fueron aquellas para las que se obtuvieron una máxima formación de trisacáridos.

Tabla R13.- Constantes de velocidad de la reacción a la temperatura óptima para la formación de trisacáridos con las β -galactosidasas de Pectinex Ultra SP-L (333K) y Lactozym 3000L HPG (323K).

Constantes de reacción	<i>A. aculeatus</i> (Pectinex Ultra SP-L)	<i>K.lactis</i> (Lactozym 3000 L HP-G)
	Valores obtenidos para las constantes de velocidad	
k_1	$2,8 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$	$1,3 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$
k_3	$6,4 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$	$4,8 \cdot 10^{-1} \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$
k_{-3}	$1,1 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$	$3,3 \cdot 10^1 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$
k_4	$2,3 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$	$5,7 \cdot 10^{-1} \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$
k_{-4}	$1,3 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$	$1,1 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$
k_6	$1,3 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$	$8,8 \cdot 10^{-1} \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$
k_{-6}	$4,0 \cdot 10^1 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$	$1,3 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$

Tal y como podemos observar en la tabla, la constante k_1 de formación del complejo EGal es mucho mayor para la β -galactosidasa de *K.lactis* que de *A. aculeatus*, indicando una mayor de velocidad de formación de dicho complejo e indicando, por lo tanto, una disminución más rápida de la concentración de lactulosa en el medio de reacción. A pesar de que los resultados de identificabilidad indican una gran dependencia de las constantes directa e inversa, podemos establecer, para el conjunto de parámetros aquí mostrados, una serie de conclusiones que nos dan una idea del comportamiento de ambas enzimas en la formación de oligosacáridos derivados de la lactulosa. Así, para el caso de la β -galactosidasa de *A. aculeatus* (Pectinex Ultra SP-L) los valores obtenidos para la constante de formación de los trisacáridos (k_3) resultó ser mayor que el valor obtenido para la formación de los disacáridos; sin embargo, los valores obtenidos para las reacciones inversas (k_{-3} y k_{-4}) fueron del mismo orden de magnitud. Esto podría indicar que tanto la hidrólisis de los trisacáridos como de los disacáridos tendrían lugar con la misma intensidad. Así para la β -galactosidasa de *A.aculeatus*

puede decirse que la lactulosa es un mejor aceptor para formar trisacáridos actuando, por lo tanto la galactosa como peor aceptor. Los valores para las constantes de velocidad para la reacción de hidrólisis (k_6 , k_{-6}) indicaron que la reacción donde el agua actúa como receptor no está favorecida.

4.3. ESTUDIOS DE FERMENTACIÓN *IN VITRO* DE LOS OLIGOSACÁRIDOS SINTETIZADOS

Como es sabido, la fermentación en el tracto gastrointestinal es un proceso complejo y los productos finales metabolizados por unas especies pueden ser utilizados como sustratos de otras; además, algunos microorganismos se benefician de los sustratos que otras bacterias no son capaces de utilizar (Gibson y col., 2005). Por ello, para estudiar el posible carácter prebiótico de los OS sintetizados, se llevaron a cabo diferentes ensayos de fermentación con cultivos puros de diferentes cepas de lactobacilos y ensayos de fermentación con muestras fecales.

4.3.1. Fraccionamiento de los oligosacáridos sintetizados y comerciales (VivinalGOS) para llevar a cabo los ensayos de fermentación

Durante la hidrólisis enzimática de la lactosa y la lactulosa con β -galactosidasas tanto de *K. lactis*, como de *A. aculeatus*, se obtienen, como hemos indicado, mezclas de oligosacáridos con enlaces $\beta(1\rightarrow6)$, $\beta(1\rightarrow4)$ y $\beta(1\rightarrow3)$. Además de estos OS, la composición de la mezcla estaba constituida por lactosa o lactulosa sin reaccionar, altas cantidades de monosacáridos y otros disacáridos. Con objeto de obtener fracciones enriquecidas en los OS que pudieran presentar propiedades prebióticas, la mezcla se sometió a un proceso de purificación. En la figura R45 se muestran los perfiles cromatográficos obtenidos tras el análisis por HPAEC-PAD del fraccionamiento de las mezclas de transgalactosilación de lactosa (A) y lactulosa (B) obtenidas con β -galactosidasas de *K. lactis* (GOS-1 y GOS-3) y *A. aculeatus* (GOS-2 y GOS-4). Asimismo, con objeto de realizar un estudio comparativo del carácter prebiótico se realizó un fraccionamiento de la mezcla comercial VivinalGOS (Figura R45C). Como puede observarse, en el caso de los GOS derivados de la lactosa (GOS-1, GOS-2) se aprecia un pico mayoritario correspondiente a la 6'-galactosil-lactosa. Sin embargo, en el caso de los derivados de la lactulosa (GOS-3, GOS-4) se aprecian dos picos correspondientes a la 6'-galactosil-lactulosa y la 1-galactosil-lactulosa, siendo este último minoritario en la mezcla GOS-4. Por lo que se refiere al producto comercial VivinalGOS, el oligosacárido mayoritario tras el fraccionamiento fue la 4'-galactosil-lactosa.

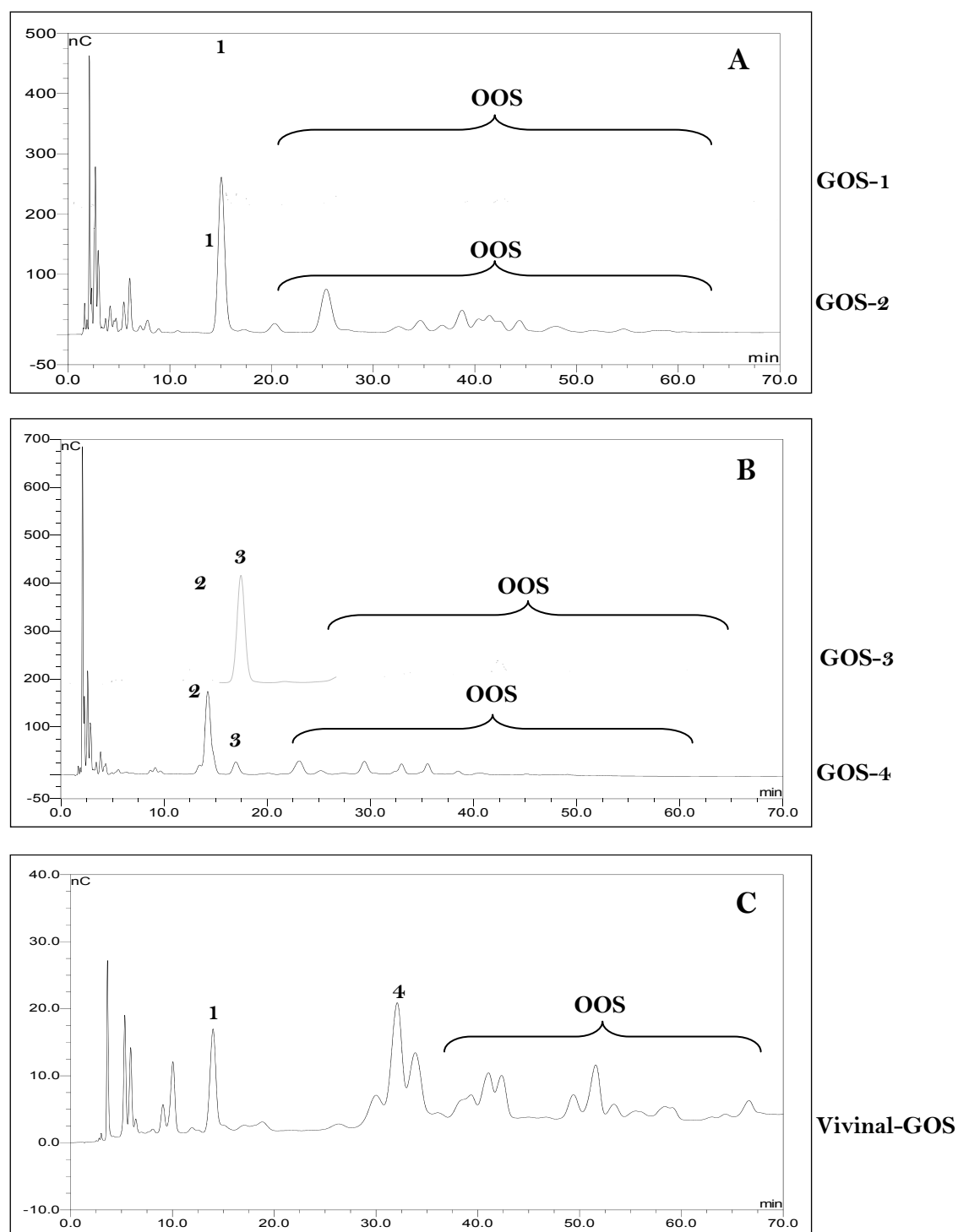


Figura R45.- Perfiles obtenidos por HPAEC-PAD de las fracciones con DP ≥ 3 de las mezclas de transgalactosilación a partir de lactosa (A) o lactulosa (B) con las β -galactosidasas de *K. lactis* (GOS-1 y GOS-3) y *A. aculeatus* (GOS-2 y GOS-4) (C) del preparado comercial VivinalGOS. Picos: (1) 6'-galactosil-lactosa, (2) 6'-galactosil-lactulosa, (3) 1-galactosil-lactulosa y (4) 4'-galactosil-lactosa. OOS: otros oligosacáridos presentes en la mezcla de reacción.

Tal y como se observa en la Figura R415, el perfil cromatográfico del VivinalGOS es completamente diferente a los obtenidos por transgalactosilación a partir de lactosa y lactulosa. Dado que, el VivinalGOS es un preparado comercial obtenido con β -galactosidasas que producen principalmente oligosacáridos con enlaces $\beta(1\rightarrow4)$, la mezcla ya purificada resultó ser una mezcla de oligosacáridos con un grado de polimerización entre 3 y 7 siendo la 4'-galactosil-lactosa el compuesto mayoritario (55%).

En la tabla R14 se muestra la composición de las mezclas de oligosacáridos después de ser fraccionadas.

Tabla R14.- Composición (% de carbohidratos totales) en oligosacáridos con $DP \geq 3$ de las mezclas de reacción purificadas.

	GOS-1	GOS-2	GOS-3	GOS-4	VivinalGOS
6'-galactosyl lactosa	81	42	-	-	15
4'-galactosil-lactosa	-	8	-	-	24
6'-galactosil-lactulosa	-	-	36	47	-
1-galactosil-lactulosa	-	-	47	6	-
Otros oligosacáridos	19	50	17	47	61

*GOS-1: oligosacáridos obtenidos a partir de lactosa con la β -galactosidasa de *K. lactis*

GOS-2: oligosacáridos obtenidos a partir de lactosa con la β -galactosidasa de *A. aculeatus*

GOS-3: oligosacáridos obtenidos a partir de lactulosa con la β -galactosidasa de *K.lactis*

GOS-4: oligosacáridos obtenidos a partir de lactulosa con la β -galactosidasa de *A. aculeatus*

4.3.2. Determinación del crecimiento de microorganismos puros en los oligosacáridos sintetizados

Las bacterias poseen diferente capacidad para fermentar los oligosacáridos, tal y como se ha demostrado en numerosos estudios realizados con GOS en cultivos puros (Gopal y col., 2001, van Laere y col., 2000). Por ello, en esta memoria se ha realizado un estudio del potencial de los oligosacáridos sintetizados para estimular el crecimiento como cultivos puros *in vitro* de varias cepas de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Streptococcus*, considerando la influencia sobre el crecimiento bacteriano que pueda tener la estructura de los oligosacáridos sintetizados (composición en monosacáridos y tipo de enlace glicosídico). Para

llevar a cabo este estudio se han utilizado los trisacáridos puros aislados de las mezclas de GOS de lactosa y de lactulosa (Apartado 3.5.1.3), 6'-galactosil-lactosa, 6'-galactosil-lactulosa, 1-galactosil-lactulosa, 4'-galactosil-lactosa y 4'-galactosil-lactulosa, además de utilizar también lactosa y lactulosa.

Las curvas de crecimiento de las 8 cepas de lactobacilos y de la cepa de estreptococo cultivadas aeróbicamente con los diferentes oligosacáridos como única fuente de carbono, se muestran en la Figura R46. Con objeto de relacionar el crecimiento microbiano y la utilización de los sustratos, se calculó la velocidad máxima (μ_{\max}) de crecimiento de los microorganismos. En la tabla R15 quedan reflejados estos valores y el tiempo de fase de latencia (lag) para cada uno de los oligosacáridos estudiados.

Como puede observarse en las gráficas de crecimiento (Figura R46), la utilización de los carbohidratos ensayados por los microorganismos fue variable, dando lugar a diferentes perfiles de crecimiento. *S. salivarius* ZL50-7 fue capaz de crecer en todos los oligosacáridos sintetizados que se ensayaron, alcanzando una μ_{\max} de 0.490 h^{-1} cuando se utilizó lactosa como fuente de carbono, la más elevada de todas las cepas y todos los sustratos. Cuando *S. salivarius* ZL50-7 creció con lactulosa, 6'-galactosil-lactosa, 6'-galactosil-lactulosa y 1-galactosil-lactulosa alcanzó valores de DO_{600} similares a los obtenidos con lactosa, alrededor de 1,0-1,1, aunque los valores de μ_{\max} fueron menores, oscilando entre $0,284\text{-}0,378 \text{ h}^{-1}$. El empleo de los 4-galactosil-oligosacáridos dió lugar a valores de DO_{600} inferiores (50% y 35% de los valores máximos obtenidos con lactosa como fuente de carbono, para 4'-galactosil-lactosa y 4'-galactosil-lactulosa, respectivamente), y a un crecimiento más lento, aunque la fase de latencia del crecimiento se redujo. *L. salivarius* CELA2 y *L. fermentum* Lc40 también crecieron en todos los oligosacáridos ensayados, mostrando un comportamiento similar al de *S. salivarius* ZL50-7. Sin embargo, *L. salivarius* CELA2 alcanzó las μ_{\max} más elevadas cuando creció con 1-galactosil-lactulosa ($0,471 \text{ h}^{-1}$) y 6'-galactosil-lactosa ($0,443 \text{ h}^{-1}$) como fuente de carbono.

L. plantarum CIC17, *L. murinus* PHY2, y *L. animalis* PDA1 crecieron, en distinto grado, mejor en lactulosa que en lactosa, y utilizaron bien los trisacáridos 6'-galactosil-lactosa, 6'-galactosil-lactulosa y 1-galactosil-lactosa, siendo, en general, los compuestos con enlace $\beta(1\rightarrow6)$ mejor utilizados que el $\beta(1\rightarrow1)$. *L. plantarum* CIC17 presentó valores de fase de latencia relativamente altos, considerando que el resto de las cepas ensayadas mostraron en general fases de latencia de entre 2 y 5 h, dependiendo de la cepa y del sustrato (Tabla R15). En el caso de *L. plantarum* CIC17 el valor mínimo encontrado fue de 4,3 h para la 1-galactosil-lactulosa, y el máximo de 7,2 h para la lactulosa.

L. paracasei LC-01 creció en todos los oligosacáridos, siendo lactosa y lactulosa los sustratos que generaron un mayor crecimiento y más rápido ($\mu_{\max} \sim 0,11 \text{ h}^{-1}$), aunque con un tiempo de latencia mayor que en el caso de otras cepas (Tabla R15). A diferencia de las cepas anteriores, *L. paracasei* LC-01 sí que fue capaz de crecer con 4'-galactosil lactulosa como fuente de carbono a niveles similares a lactosa y lactulosa, aunque con μ_{\max} inferiores. La duración de las fases de latencia de *L. paracasei* LC-01 también fue relativamente elevada, con un mínimo de 6,4 h para la 6'-galactosil lactulosa y de 9,4 h para la 4'-galactosil-lactulosa.

L. reuteri R13 (Figura R46h) utilizó de forma muy parecida para su crecimiento todos los oligosacáridos, incluidos los 4'-galactosil-oligosacáridos, alcanzando DO_{600} entre 0,9 y 1,2, aunque creció mejor en los derivados de lactosa que en los de lactulosa. Su μ_{\max} con lactosa fue de $0,362 \text{ h}^{-1}$, pero el crecimiento más rápido se logró cuando se utilizó 6'-galactosil-lactosa ($0,424 \text{ h}^{-1}$) como fuente de carbono. Es destacable el hecho de que *L. reuteri* R15 obtuviera una μ_{\max} de $0,410 \text{ h}^{-1}$ cuando creció con 4'-galactosil-lactosa, valor muy elevado y el mayor obtenido para este sustrato con todas las cepas. En cambio, el crecimiento más lento de esta cepa se observó cuando se empleó 4'-galactosil-lactulosa ($\mu_{\max} \sim 0,1 \text{ h}^{-1}$) como sustrato.

Por último, *L. plantarum* CLB7 se caracterizó por no ser capaz de crecer con lactosa como fuente de carbono y por presentar fases de latencia muy largas con todos los oligosacáridos ensayados, comprendidos entre las 16,1 h para la 4'-galactosil-lactulosa y las 29,1 h para la 6'-galactosil lactulosa. Esta cepa creció mejor con los oligosacáridos que contenían lactulosa en lugar de lactosa, siendo la 1-galactosil-lactulosa el sustrato con el que se obtuvieron mayores valores de DO_{600} , en torno a 1,1 a las 48 h. El crecimiento de *L. plantarum* CLB7 fue muy lento, observándose las μ_{\max} más bajas de todas las cepas, inferiores a $0,040 \text{ h}^{-1}$ con todos los sustratos

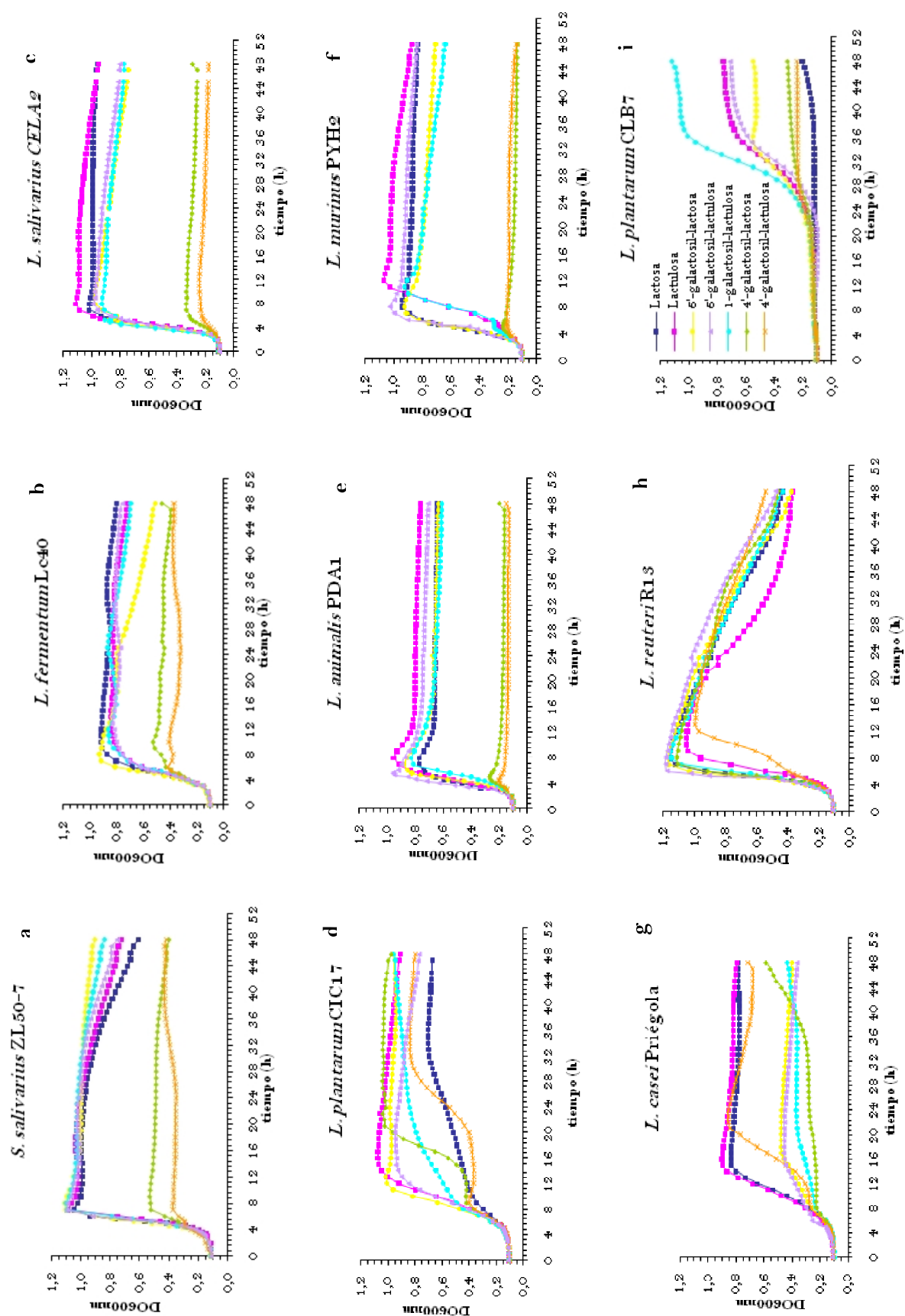


Figura R46.- Curvas de crecimiento para las cepas bacterianas estudiadas con los sustratos lactosa (■), lactulosa (▲), 6'-galactosil-lactulosa (●), 6'-galactosil-lactulosa (◆), 1'-galactosil-lactulosa (×), 1'-galactosil-lactulosa (+), 4'-galactosil-lactulosa (*) y 4'-galactosil-lactulosa (x).

Tabla R 15. -Velocidades máximas de crecimiento (m_{\max}) en h^{-1} y tiempos de latencia (lag) en h de las bacterias ácido lácticas tras la fermentación con diferentes tipos de oligosacáridos (datos normalizados).

	<i>S. salivarius</i>		<i>L. salivarius</i>		<i>L. fermentum</i>		<i>L. plantarum</i>		<i>L. plantarum</i>		<i>L. animalis</i>		<i>L. murinus</i>		<i>L. paracasei</i>		<i>L. reuteri</i>	
	μ_{\max}	lag	μ_{\max}	lag	μ_{\max}	lag	μ_{\max}	Lag	μ_{\max}	lag	μ_{\max}	lag	μ_{\max}	lag	μ_{\max}	lag	μ_{\max}	lag
	ZL50-7	CEL A2	Lc40	CLB7	CIC17	PDA1	PYH2	LC-01	R13									
Lactosa	0,490	4,07	0,367	3,89	0,169	3,86	-	-	0,044	4,68	0,220	3,16	0,226	3,28	0,110	7,85	0,362	4,16
Lactulosa	0,336	3,56	0,387	4,05	0,115	3,65	0,038	28,05	0,141	7,22	0,160	3,72	0,156	7,80	0,108	7,45	0,224	4,69
6'-galactosil-lactosa	0,323	3,27	0,443	3,06	0,175	3,43	0,012	29,11	0,153	6,59	0,316	3,19	0,266	3,22	0,034	3,90	0,424	3,85
6'-galactosil-lactulosa	0,378	3,83	0,383	3,79	0,141	3,73	0,027	23,04	0,121	6,36	0,185	3,43	0,193	3,63	0,033	3,63	0,328	4,23
4'-galactosil-lactulosa	0,144	2,66	0,075	2,90	0,037	2,64	0,011	18,71	0,058	8,25	0,086	2,52	0,057	2,11	0,033	4,43	0,410	4,11
4'-galactosil-lactulosa	0,120	2,90	0,039	2,43	0,040	2,53	0,009	16,08	0,023	6,72	0,056	2,23	0,039	1,74	0,053	9,42	0,100	3,34
1-galactosil-lactulosa	0,284	3,29	0,471	2,93	0,124	3,50	0,034	28,85	0,056	4,27	0,206	3,50	0,137	4,62	0,035	4,32	0,322	4,02

En cuanto a las cepas crecidas anaeróbicamente, en la Tabla R16 se muestran los valores de densidad óptica (DO) alcanzados con las diferentes fuentes de carbono.

Tabla R16.- Valores de densidad óptica (DO_{600nm}) después de 24 y 48 h de crecimiento de las cepas anaeróbicas utilizando como fuentes de carbono lactosa, lactulosa y sus derivados.

	<i>B. lactis</i> BB12		<i>B. breve</i> 26M2		<i>L. acidophilus</i> LA-5	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Lactosa	0,02	0,76	0,03	1,06	1,04	0,99
Lactulosa	0,00	0,03	0,01	0,86	0,43	0,97
6'-galactosil-lactosa	0,16	0,83	0,00	0,90	0,45	0,76
6'-galactosil-lactulosa	0,12	0,72	0,00	0,64	0,17	0,89
4'-galactosil-lactosa	0,10	0,07	0,01	0,02	0,90	0,83
4'-galactosil-lactulosa	0,03	0,03	0,01	0,01	0,61	0,73
1-galactosil-lactulosa	0,61	0,72	0,03	0,97	0,18	0,80

Tal y como puede observarse, las cepas de *B. lactis* y *B. breve* alcanzaron sus valores máximos de densidad óptica tras 48 h de fermentación. En el primer caso, esta cepa fue capaz de utilizar lactosa, 6'-galactosil-lactosa, 6'-galactosil-lactulosa y 1-galactosil-lactulosa, no creciendo en el resto de sustratos. Lo mismo ocurrió con la cepa de *B. breve* con la única diferencia de que también fue capaz de crecer en lactulosa. La cepa de *L. acidophilus* LA5, por otro lado, fue capaz de utilizar todos los carbohidratos como fuente de carbono, creciendo más rápidamente para la lactosa y la 4'-galactosil-lactosa (valores superiores de DO tras 24 h de fermentación) pero alcanzando para todos los sustratos valores similares de DO tras 48 h.

Estudios previos llevados a cabo por diferentes autores (Tanaka y col., 1983; Ishikawa y col., 1995; Yanashira y col., 1995) mostraron que mientras la mayor parte de las bifidobacterias del intestino humano podían utilizar fácilmente los GOS como fuente de carbono, otros géneros como los lactobacilos, sólo presentaban esta capacidad ciertas cepas. Sin embargo, en el estudio presentado en esta memoria se ha visto como todas las cepas ensayadas de lactobacilos utilizan los oligosacáridos como sustrato mostrando, de manera general, preferencia por aquellos con enlaces $\beta(1\rightarrow6)$ y $\beta(1\rightarrow1)$, lo que indica que los nuevos oligosacáridos derivados de la lactulosa con ese tipo de enlaces podrían ser considerados como potenciales ingredientes prebióticos.

4.3.3. Determinación del carácter bifidogénico

Una vez obtenidas y caracterizadas las fracciones de oligosacáridos con $DP \geq 3$ derivadas de lactosa y lactulosa se procedió a realizar un estudio sobre la estimulación del crecimiento de bifidobacterias en muestras fecales, con objeto de comprobar el efecto bifidogénico de dichos carbohidratos en presencia de bacterias de la flora intestinal. Para ello, dichas fracciones se mezclaron con muestras de heces procedentes de tres individuos sanos, realizándose los cultivos en condiciones de anaerobiosis (Apartado 3.4.2.2.1).

La Figura R47 muestra los resultados correspondientes al análisis por RT-qPCR representándose los incrementos del crecimiento de los microorganismos. Como puede observarse, el grado de estimulación varió en función del carbohidrato utilizado y del individuo. La población de bifidobacterias aumentó con el tiempo de incubación, detectándose el mayor incremento para el individuo 1 que fue el que, curiosamente, presentó el nivel inicial más bajo (Log UFC/mL $8,28 \pm 0,13$; $8,51 \pm 0,02$ y $8,60 \pm 0,05$ para los individuos 1, 2 y 3 respectivamente). Después de 8 y 24 horas de incubación la población microbiana aumentó en todos los medios que contenían los oligosacáridos a estudio, así como en los de lactulosa, lactosa y glucosa. En los cultivos fecales del individuo 3 tras 24 h de incubación la población de bifidobacterias sufrió un incremento del mismo orden que los cultivos que contenían carbohidratos, por ello, es únicamente en este caso donde no puede decirse que exista un efecto estimulador del crecimiento bacteriano por parte de los carbohidratos testados.

Para un mismo individuo, no se observaron diferencias importantes entre las cuatro muestras de GOS ensayadas. En general, los GOS derivados de la lactosa y la lactulosa promovieron un mayor crecimiento de las bifidobacterias que el producido por estos mismos disacáridos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en estudios anteriores en los que se ha demostrado que, de manera general, los oligosacáridos con $DP \geq 3$ muestran una mayor selectividad hacia las bifidobacterias (Kaneko y col., 1994; Kaplan y Hutkins, 2000).

Además, generalmente los oligosacáridos con enlaces $\beta(1 \rightarrow 2)$, $\beta(1 \rightarrow 4)$ y $\beta(1 \rightarrow 6)$ poseen un efecto prebiótico mayor que otros oligosacáridos con enlaces diferentes (Sanz y col., 2005). Sin embargo no se sabe cuál podría ser el efecto del enlace $\beta(1 \rightarrow 1)$ en las características prebióticas de los oligosacáridos que lo contienen. Por ello, no sólo el DP sino también la presencia de diferentes tipos de enlace en las mezclas de oligosacáridos derivados de la lactulosa pueden estar influyendo en la fermentación por parte de las bifidobacterias.

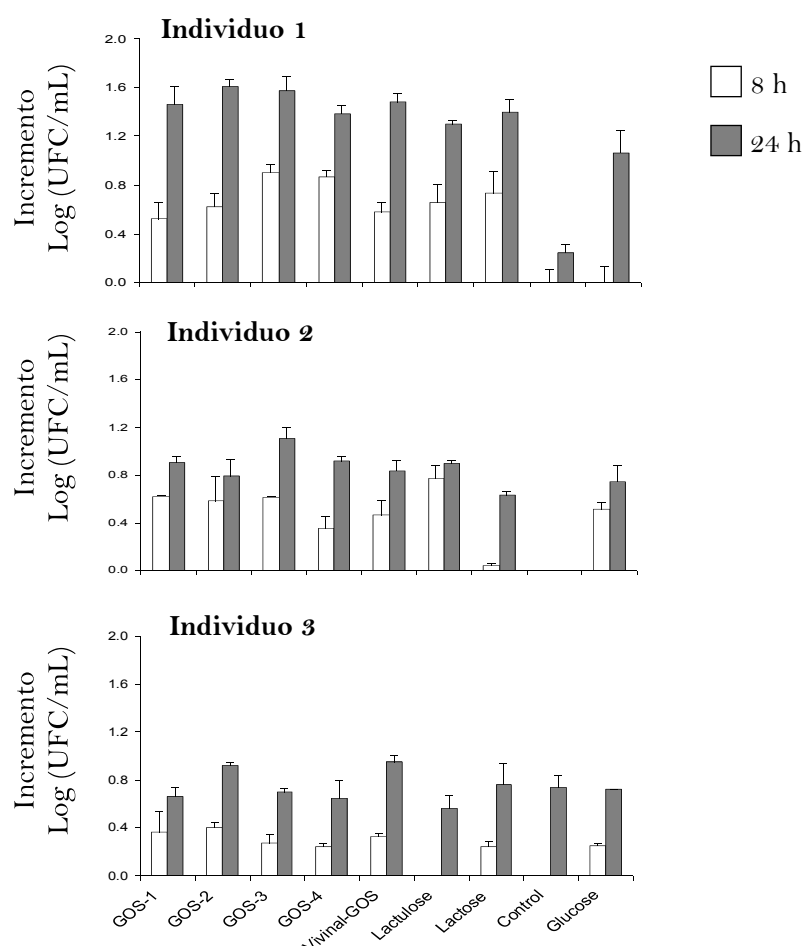


Figura R47.- Incremento con respecto al tiempo inicial (0 h) de las Bifidobacterias medidas por RT-qPCR en cultivos con muestras fecales obtenidas de 3 donantes utilizando como fuente de carbono mezclas de GOS purificadas (obtenidas de lactosa y lactulosa), lactulosa, Vivinal GOS, lactosa o glucosa después de 8 horas (barras blancas) y 24 h (barras grises) de incubación. Los controles no contienen carbohidratos como fuente de carbono. Los valores iniciales de bifidobacterias expresadas en Log UFC/mL fueron: donante 1= $8,28 \pm 0,13$, donante 2= $8,51 \pm 0,02$, donante 3= $8,60 \pm 0,05$. Las barras de error indican la desviación estándar.

Aunque para profundizar en este hecho sería necesario llevar a cabo estudios más completos, estos resultados indican claramente que las mezclas de GOS derivadas de lactosa y lactulosa cuya composición incluye compuestos mayoritarios con enlaces $\beta(1 \rightarrow 6)$ y/o $\beta(1 \rightarrow 1)$ exhiben, dependiendo del individuo, un efecto bifidogénico similar o incluso mayor que sus precursores y que el producto comercial VivinalGOS.

Una vez estudiado el comportamiento de las bifidobacterias en medios que contenían los OS sintetizados y comerciales purificados como fuente de carbono se procedió a la determinación de los SCFAs producidos como consecuencia del metabolismo de dichas bacterias.

Los análisis por GC-MS mostraron, en general (Tabla R17), un incremento de los SCFAs después de 8 y 24 horas de incubación, que fue mucho más

pronunciado, como era de esperar, en las muestras a las que se les añadieron los carbohidratos que en los controles, sin carbohidratos. Esto indica que todos los carbohidratos ensayados pueden actuar como sustratos fermentables para la microbiota intestinal, aumentando claramente la producción de SCFAs durante la incubación. La diferencia entre los individuos fueron evidentes con respecto a la cantidad de SCFAs totales producidos al final de la incubación, al igual que sucedía con el incremento en bifidobacterias. El orden en función de esa cantidad producida fue Individuo 1>Individuo 2> Individuo 3. Para cada individuo, y especialmente en el individuo 1, el incremento de los ácidos propiónico y butírico fue moderado mientras que el aumento del ácido acético fue muy superior. Este incremento en la producción de ácido acético está directamente relacionado con el incremento de bifidobacterias en los cultivos fecales analizados por PCR cuantitativa (Tabla R17 y Figura R47). Como resultado de este comportamiento la relación acético/ propiónico aumentó durante el tiempo de fermentación en los individuos 1 y 2. Esta relación puede ser útil, en muchos casos, por ser un indicador del efecto hipolipidémico de los prebióticos (Salazar y col., 2008), ya que a mayor concentración de propionato en sangre con respecto a la concentración de acetato, menor será la concentración de lípidos en sangre. Como puede observarse, teniendo en cuenta la relación acético/ propiónico, presentarían características hipolipidémicas similares a las de la lactulosa. Varios autores han descrito el aumento de la producción de SCFA con lactulosa y otros prebióticos utilizando modelos *in vitro* e *in vivo* (Macfarlane y col., 2006). Rycroft y col., (2001) destacaron que la lactulosa y los GOS cuando son fermentados por las bifidobacterias dan lugar a una mayor producción de ácido acético y SCFAs totales que otros oligosacáridos.

Con respecto al tipo de carbohidrato ensayado en la producción de SCFAs, no se encontraron diferencias entre los cultivos llevados a cabo con los distintos tipos de OS para el individuo 3, quién fue el menor productor de SCFAs. Sin embargo, en los cultivos realizados con los individuos 1 y 2, la fermentación de la lactosa y la glucosa produjo menor cantidad de SCFAs mientras que las fracciones de GOS-2, GOS-3 y GOS-4 fueron consumidos por las bifidobacterias alcanzando niveles de ácido acético y SCFAs totales similares a los del Vivinal GOS y, moderadamente más elevados que los de la lactulosa, especialmente para el individuo 1, que fue el mayor productor de SCFAs.

Estos resultados muestran que, a pesar de la variabilidad individual, los nuevos oligosacáridos derivados de la lactulosa actúan como sustratos fermentables para las bacterias intestinales *in vitro*, aumentando la producción de ácido acético y SCFAs totales y promoviendo el crecimiento de bifidobacterias en cultivos fecales humanos.

Tabla R17.- Concentraciones (mM) de tres de los SCFA mayoritarios en cultivos fecales de tres donantes utilizando mezclas purificadas de OS derivados de lactosa y lactulosa, Vivinal-GOS fraccionado, lactulosa, lactosa y glucosa como fuentes de carbono. *Relación A/P; Relación acético/propiónico

Tiempo	Muestra	Individuo 1					Individuo 2					Individuo 3				
		Acético	Propiónico	Butírico	Total	*Relación A/P	Acético	Propiónico	Butírico	Total	*Relación A/P	Acético	Propiónico	Butírico	Total	*Relación A/P
0 h	Control	20.43±0.26	5.24±0.40	3.31±0.1	28.97±0.76	3.91±0.25	30.25±3.18	3.85±0.45	3.96±0.44	38.04±4.06	7.87±0.1	21.12±0.64	2.36±0.11	3.12±0.08	26.60±0.83	8.97±0.15
	Control	27.53±1.22	4.04±0.12	4.74±0.015	36.30±1.48	6.81±0.09	22.40±0.48	2.82±0.19	3.06±0.03	28.08±0.64	8.55±0.44	22.34±0.40	2.74±0.07	3.05±0.04	28.13±0.50	8.15±0.04
8 h	GOS-1	34.93±1.85	6.16±0.00	5.06±0.16	46.14±2.00	5.67±0.29	24.73±0.03	2.54±0.01	2.94±0.02	30.21±0.05	9.72±0.04	24.38±0.06	2.92±0.02	3.47±0.00	30.77±0.08	8.33±0.03
	GOS-2	38.21±2.03	5.59±0.34	5.29±0.11	49.10±2.47	6.83±0.053	37.14±1.00	4.20±0.05	4.04±0.05	45.37±1.09	8.84±0.13	26.37±0.06	3.62±0.00	3.46±0.00	33.46±0.07	7.28±0.008
	GOS-3	39.27±0.48	6.20±0.04	5.48±0.02	50.95±0.45	6.33±0.11	36.42±0.24	4.10±0.03	4.00±0.03	44.52±0.18	8.87±0.11	24.20±0.09	2.87±0.01	3.32±0.00	30.40±0.09	43±0.00
	GOS-4	39.33±0.08	5.54±0.09	5.19±0.02	50.06±0.03	7.09±0.13	37.56±3.27	4.00±0.38	3.80±0.32	45.36±3.96	9.38±0.07	27.73±0.18	3.61±0.01	3.78±0.01	35.13±0.18	7.67±0.07
	Vivinal	41.85±0.53	5.60±0.07	5.27±0.06	52.71±0.65	7.47±0.002	36.68±0.73	3.85±0.10	3.88±0.05	44.40±0.88	9.53±0.06	27.98±0.90	3.72±0.27	3.70±0.02	35.40±1.20	7.53±0.30
	Lactulosa	41.97±1.03	5.16±0.39	5.60±0.07	52.73±1.36	8.15±0.42	32.17±1.29	3.51±0.31	3.36±0.11	39.03±1.71	9.19±0.45	28.84±0.08	3.97±0.02	3.70±0.00	36.52±0.10	7.25±0.01
	Lactosa	45.73±1.30	6.10±0.16	6.05±0.15	57.87±1.61	7.5±0.013	37.33±0.72	3.73±0.13	3.82±0.08	44.87±0.93	10.01±0.14	28.28±0.94	3.78±0.31	3.61±0.04	35.66±1.29	7.49±0.35
	Glucosa	33.72±0.11	4.62±0.03	5.42±0.07	43.76±0.20	7.29±0.02	31.16±1.23	3.97±0.71	4.09±0.02	39.42±1.95	8.03±1.15	23.83±2.85	3.81±0.09	3.46±0.02	31.10±2.74	6.27±0.89
24 h	Control	44.78±8.67	5.55±1.19	8.33±1.72	58.65±11.58	8.10±0.18	27.13±0.15	4.08±0.0	4.09±0.06	35.30±0.28	6.64±0.10	27.72±0.36	3.44±0.09	4.02±0.06	35.18±0.51	8.06±0.09
	GOS-1	76.89±19.88	9.45±2.75	11.27±3.20	97.6±25.83	8.19±0.28	35.04±0.44	3.25±0.13	2.88±0.06	41.16±0.62	10.79±0.29	29.28±0.05	4.39±0.00	4.92±0.06	38.60±0.11	6.66±0.00
	GOS-2	100.35±22.13	11.74±2.72	14.65±3.37	126.74±28.22	8.56±0.10	40.22±0.12	4.22±0.01	4.09±0.02	48.52±0.15	9.52±0.00	30.23±0.15	4.91±0.01	4.68±0.03	39.82±0.19	6.15±0.02
	GOS-3	111.81±21.49	13.90±3.04	16.22±3.35	141.92±27.88	8.07±0.22	38.97±0.34	4.45±0.40	3.91±0.04	47.32±0.78	8.80±0.72	31.25±0.70	5.54±0.16	5.73±0.13	42.52±1.00	5.64±0.04
	GOS-4	118.88±25.22	14.20±3.56	16.82±4.26	149.9±33.04	8.42±0.34	38.27±0.39	3.94±0.28	3.38±0.05	45.58±0.15	9.75±0.79	28.74±0.91	4.67±0.24	5.23±0.02	38.64±1.18	6.16±0.12
	Vivinal	120.46±15.54	14.08±2.02	15.50±2.25	150.04±19.8	8.56±0.12	39.63±0.55	3.86±0.00	3.83±0.05	47.32±0.59	10.26±0.13	29.32±0.15	4.87±0.00	4.19±0.03	38.38±0.11	6.01±0.03
	Lactulosa	74.71±14.65	8.29±1.76	10.38±2.14	93.38±18.54	9.03±0.15	37.19±0.31	3.58±0.02	3.14±0.03	43.91±0.35	10.38±0.03	29.85±0.02	5.14±0.03	4.48±0.01	39.47±0.00	5.81±0.03
	Lactosa	65.16±6.35	7.97±0.64	9.06±0.89	82.19±7.87	8.16±0.13	37.97±0.06	3.59±0.05	3.77±0.02	45.33±0.01	10.57±0.16	28.87±0.01	4.80±0.02	3.76±0.02	37.23±0.00	5.97±0.01
	Glucosa	55.72±4.63	8.16±0.52	9.44±1.45	73.31±6.60	6.82±0.13	28.93±1.45	3.49±0.09	3.77±0.02	36.18±1.53	8.28±0.19	30.51±0.12	5.37±0.08	3.89±0.04	39.77±0.08	5.66±0.10

4.3.4. Determinación del carácter prebiótico

Con objeto de estudiar el comportamiento, frente a los oligosacáridos sintetizados, de un mayor grupo de bacterias constituyentes de la flora intestinal, se realizaron fermentaciones utilizando muestras fecales humanas en las que se determinó el crecimiento de los grupos bacterianos *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Atopobium* y *Clostridium*.

La técnica utilizada para medir la población bacteriana fue FISH y en la Figura R48 se muestran, a modo de ejemplo, alguno de los géneros bacterianos vistos bajo el microscopio de fluorescencia.

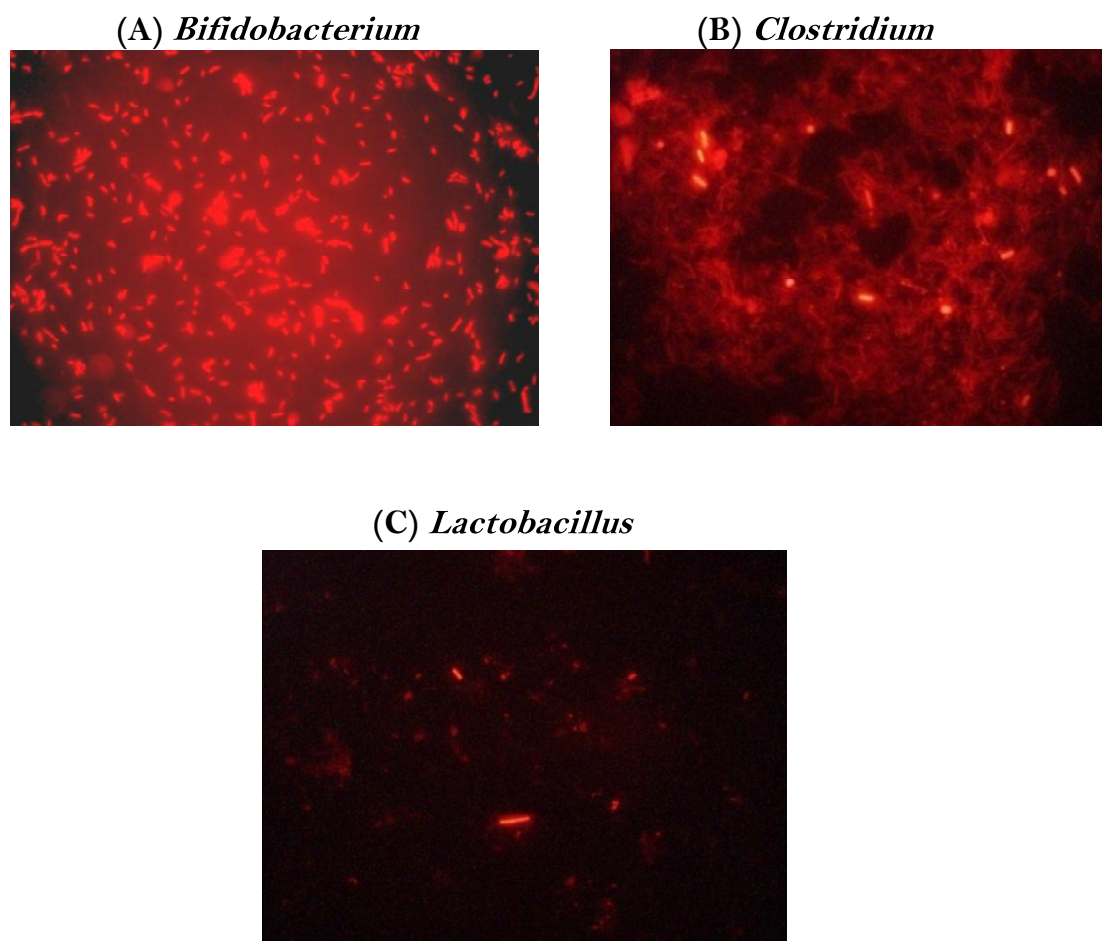


Figura R48.- Fotografías de las poblaciones de *Bifidobacterium* (A), *Clostridium* (B) y *Lactobacillus* (C) obtenidas de los medios conteniendo muestras fecales y los OS sintetizados sometidas a un procedimiento FISH para su recuento por el microscopio de fluorescencia.

Los cambios observados en las poblaciones bacterianas estudiadas para los diferentes carbohidratos ensayados después de tiempos de incubación de 0, 5, 10 y 24 h se muestran en la Figuras R49 (a-c) y R50 (d-f). Se realizó un tratamiento estadístico de los datos de crecimiento bacteriano en los diferentes medios ensayados y, como puede apreciarse, a las 5 h de reacción apenas existieron cambios significativos, con respecto a las 0 h, para la mayor parte de los grupos bacterianos estudiados y todos los sustratos ensayados. Concretamente, sólo se observaron cambios significativos en la población de *Lactobacillus*, y en la de *Atopobium* para VivinalGOS. A las 10 horas de fermentación las diferencias observadas, en el crecimiento bacteriano, fueron mayores y, aunque tal y como se observa en la figura, estas diferencias también existieron a las 24 h, fue a las 10 h de reacción cuando tuvo lugar el mayor cambio, con respecto al tiempo inicial (0 h). De manera general, de las 10 a las 24 h los valores se mantuvieron constantes o bien disminuyeron. Sólo en el caso del VivinalGOS y de la fracción de oligosacáridos GOS-4 se produjo un aumento en la población de bifidobacterias a las 24 horas de fermentación. También se detectó un incremento en el recuento de bacterias totales (DAPI) para los GOS-3 y los GOS-4. A la vista de los resultados, se tomó el tiempo 10 h como el óptimo de fermentación para el cual se calcularon los valores del índice prebiótico (PI). Como es sabido, estos valores proporcionan una mayor información sobre la selectividad en la fermentación de los oligosacáridos a estudio y permite la comparación entre sustratos.

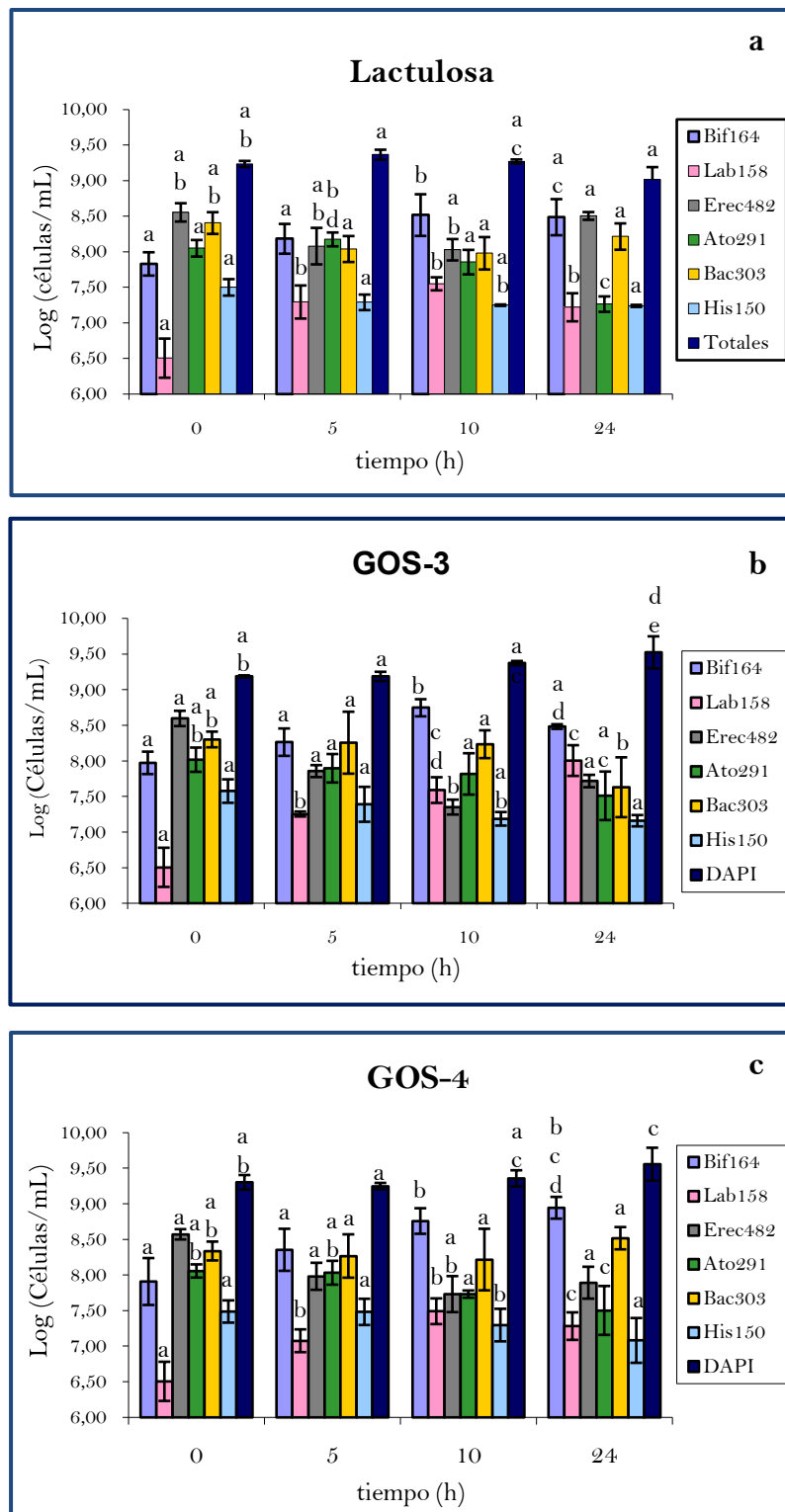


Figura R49.- Poblaciones bacterianas (Log células/mL) a 0, 5, 10 y 24 h de reacción en fermentaciones en discontinuo con pH y temperatura controlados para los sustratos: lactulosa GOS-3 y GOS-4. Las barras de error representan el error estándar. Letras distintas representan diferencias significativas con respecto al tiempo 0 ($P < 0,05$). Bif164: *Bifidobacterium* spp.; Lab158: *Lactobacillus/Enterococcus*; Erec482: *Eubacterium*; Ato291: *Atopobium* (*Coriobacterium* group); Bac303: *Bacteroides/Prevotella* group; His150: *Clostridium* clusters I y II (incluyendo *Clostridium perfringens* / *Clostridium histolyticum*); DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindol, recuento bacterias totales

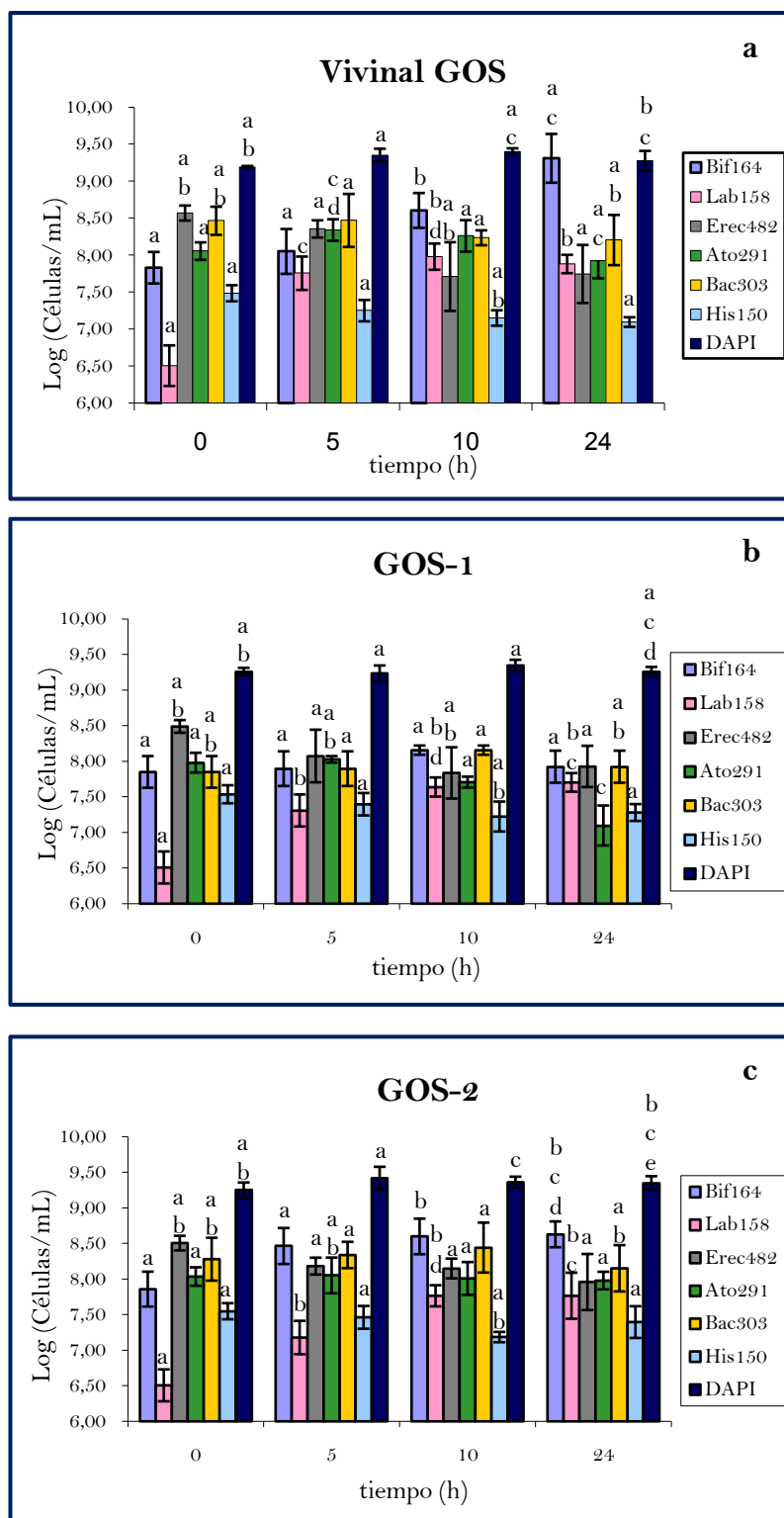


Figura R50.- Poblaciones bacterianas (Log células/mL) a 0, 5, 10 y 24 h de reacción en fermentaciones en discontinuo con pH y temperatura controlados para los sustratos: VivinalGOS, GOS-1 y GOS-2. Las barras de error representan el error estándar. Letras distintas representan diferencias significativas con respecto al tiempo 0 ($P < 0,05$). Bif164: *Bifidobacterium* spp.; Lab158: *Lactobacillus/Enterococcus*; Erec482: *Eubacterium*; Ato291: *Atopobium* (*Coriobacterium* group); Bac303: *Bacteroides/Prevotella* group; His150: *Clostridium* clusters I y II (incluyendo *Clostridium perfringens* / *Clostridium histolyticum*); DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindol, recuento bacterias totales.

En la tabla R18 se muestran los cambios observados en cada población bacteriana estudiada a 0 y 10 h de fermentación, así como el valor del PI calculado para cada uno de los carbohidratos estudiados. En cuanto a la población de bifidobacterias se observó un incremento significativo para todos los carbohidratos estudiados excepto para la fracción de GOS-1, siendo los valores más altos para GOS-3 y GOS-4 (fracciones enriquecidas en los oligosacáridos derivados de la lactulosa).

Tabla R18.- Cambios en las poblaciones bacterianas (Log Células/mL) de los cultivos fecales in vitro tras 10 horas de incubación en presencia de los diferentes substratos e Índice prebiótico (PI) para dichas muestras.

Muestras	Bacterias totales	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Eubacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Atopobium</i>	PI
0 h	9,24 (0,04) ^{a,b}	7,83 (0,16) ^a	8,41 (0,15) ^{a,b}	7,50 (0,12) ^a	8,56 (0,13) ^a	6,51 (0,28) ^a	8,25 (0,12) ^{a,b}	
Lactulosa	9,27 (0,03) ^a	8,52 (0,29) ^b	7,98 (0,23) ^a	7,25 (0,01) ^{a,b}	8,03 (0,15) ^{a,b}	7,55 (0,09) ^b	7,86 (0,17) ^a	9,6
VivinalGOS	9,40 (0,05) ^{a,c}	8,61 (0,24) ^b	8,24 (0,10) ^a	7,15 (0,10) ^{a,b}	7,71 (0,46) ^{a,b}	7,98 (0,18) ^{b,d}	8,26 (0,21) ^a	20,45
GOS-1	9,34 (0,08) ^{a,c}	8,15 (0,06) ^a	8,15 (0,06) ^a	7,22 (0,21) ^{a,b}	7,83 (0,36) ^{a,b}	7,64 (0,13) ^{b,d}	7,70 (0,08) ^a	9,63
GOS-2	9,36 (0,08) ^c	8,60 (0,25) ^b	8,44 (0,25) ^a	7,18 (0,07) ^{a,b}	8,15 (0,14) ^a	7,76 (0,15) ^{b,d}	8,01 (0,23) ^a	16,15
GOS-3	9,37 (0,07) ^{a,c}	8,75 (0,2) ^b	8,24 (0,20) ^a	7,19 (0,095) ^{a,b}	7,35 (0,11) ^b	7,59 (0,18) ^{c,d}	7,82 (0,29) ^a	13,49
GOS-4	9,36 (0,11) ^{a,c}	8,76 (0,18) ^b	8,22 (0,43) ^a	7,30 (0,23) ^b	7,73 (0,25) ^{a,b}	7,49 (0,18) ^b	7,73 (0,05) ^c	12,59

*Letras distintas representan diferencias significativas con respecto al tiempo 0 ($P < 0,05$)

En cuanto a la población de lactobacilos, se encontraron diferencias significativas con respecto al tiempo 0 h para todos los carbohidratos estudiados, obteniéndose los valores más altos en los medios que contenían GOS-2 y Vivinal GOS.

En la mezcla de oligosacáridos GOS-4 se observaron diferencias con respecto al tiempo 0 para las poblaciones de bacterias de los géneros *Clostridium* y *Atopobium*, y en la de GOS-3 para la población de *Eubacterium*. Para el resto de carbohidratos no se encontraron valores estadísticamente diferentes. La población de bacteroides, sin embargo se mantuvo constante, no encontrándose diferencias significativas en ninguno de los casos.

Los valores de PI, tal y como se ha indicado anteriormente, proporcionan una medida cuantitativa del grado de selectividad de la fermentación de los oligosacáridos por los microorganismos. La fracción ($DP \geq 3$) del producto comercial VivinalGOS fue la que mayor mostró el mayor valor, debido probablemente no sólo a su contenido en oligosacáridos con un DP de hasta 8 sino también a la diversidad de enlaces que presentan dichos oligosacáridos. Las

fracciones enriquecidas en los nuevos derivados de la lactulosa presentaron un valor de PI mayor que la lactulosa, indicando una mayor selectividad por parte de las bacterias beneficiosas de la microflora intestinal.

Para completar el estudio de fermentación, además del recuento bacteriano, también se llevó a cabo la determinación de los SCFAs originados durante el proceso de fermentación. Así, de la misma manera que para el recuento bacteriano, se obtuvieron datos para 0, 5, 10 y 24 horas de incubación. Los SCFAs determinados fueron láctico, acético, propiónico, butírico y valérico. De manera general, puede decirse que la producción de SCFAs aumentó hasta las 10 h de fermentación en los medios que contenían los oligosacáridos sintetizados y, a aunque se poseen datos de las concentraciones a todas las horas estudiadas, en la tabla R19, únicamente se muestran los valores de los SCFAs a las 10 h de fermentación por ser el tiempo al que se produjo el mayor crecimiento bacteriano. Los ácidos láctico, acético y propiónico se detectaron en todos los ensayos de fermentación realizados con los diferentes carbohidratos detectándose únicamente ácido butírico y valérico en los medios que contenían lactulosa y las fracciones de la mezcla VivinalGOS. Las fracciones de GOS-1 presentaron el menor valor de ácido láctico y acético, coincidiendo con el menor incremento de las bifidobacterias, tal y como se mostró anteriormente. El análisis estadístico llevado a cabo con los datos obtenidos mostró diferencias significativas entre la lactulosa y sus derivados, lo que indica un mayor efecto fisiológico de los últimos sobre la flora intestinal.

Los ácidos láctico y acético son productos finales típicos de la acción de bifidobacterias, mientras que el ácido butírico es generado principalmente por Clostridia y Eubacteria (Pryde y col., 2002). El ácido butírico es considerado como un metabolito deseable de las funciones de las bacterias intestinales y estudios *in vitro*, demuestran que puede inducir apoptosis de las células del cáncer de colon.

Por otra parte, se ha demostrado, que los bacteroides producen ácido propiónico (Macy y col., 1978), aunque es muy difícil atribuir un producto de fermentación a un grupo bacteriano específico en un sistema de cultivo mixto. Los bacteroides son un grupo metabólicamente versátil ya que son capaces de utilizar muchos tipos de sustratos. En nuestro caso, a pesar de que los bacteroides fueron un grupo mayoritario en los inóculos utilizados, las escasas poblaciones de bifidobacterias y lactobacilos compitieron con dicha población para utilizar los carbohidratos a estudio.

Tabla R19.- Ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) (mM) producidos después de 10 h de fermentación con lactulosa; fracciones de oligosacáridos derivados de lactosa (GOS-1, GOS-2) y lactulosa (GOS-3, GOS-4) y las fracciones de la mezcla comercial VivinalGOS (n=3) (A/P)= relación ácido acético/ácido propiónico).

	Ácido láctico	Ácido acético	Ácido propiónico	Ácido butírico	Ácido valérico	Relación A/P	Total
0h	3,50 (0,15)	2,94 (0,29)	1,25 (0,04)	-	-	2,35 (0,15)	7,68 ^a (0,25)
Lactulosa	11,46 (4,87)	23,37 (5,01)	11,00 (2,65)	1,7 (0,71)	0,60 (0,20)	2,12 (0,03)	48,13 ^b (2,15)
VivinalGOS	12,39 (3,93)	35,20 (3,45)	8,76 (4,65)	2,05 (1,17)	0,28 (0,09)	4,02 (1,46)	58,68 ^c (5,89)
GOS-1	5,61 (0,25)	10,25 (4,43)	1,99 (0,51)	-	-	5,15 (0,57)	17,86 ^a (4,84)
GOS-2	10,18 (3,57)	26,60 (4,90)	6,36 (3,47)	-	-	4,18 (1,30)	43,13 ^b (1,02)
GOS-3	11,98 (2,49)	32,52 (3,99)	12,73 (6,64)	-	-	2,55 (0,85)	57,23 ^c (1,07)
GOS-4	12,01 (2,73)	31,61 (3,72)	10,54 (4,64)	-	-	2,99 (0,71)	54,16 ^c (5,24)

*Letras distintas representan diferencias significativas con respecto al tiempo 0 ($P < 0,05$)

De la misma forma que para el estudio del efecto bifidogénico de los oligosacáridos sintetizados, se calculó la relación ácido acético/ácido propiónico (A/P), indicadora del efecto hipolipidémico. Los resultados obtenidos muestran valores superiores para las fracciones de GOS derivados de la lactosa (GOS-1 y GOS-2) seguidos de la fracción de VivinalGOS, lo que nos indica un efecto hipolipidémico menor que el de la lactulosa y sus derivados.

En resumen, de acuerdo a los resultados obtenidos, se puede decir que, los oligosacáridos derivados de la lactulosa pueden constituir una buena alternativa, como carbohidratos prebióticos a la lactulosa, debido a la mayor selectividad por parte de las bifidobacterias y los lactobacilos hacia esos carbohidratos y, en consecuencia, dando lugar a una mayor producción de SCFAs.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- Los trisacáridos, β -D-Galp(1 \rightarrow 6)- β -D-Galp(1 \rightarrow 4)-D-Fru (6'-galactosil-lactulosa) y β -D-Galp(1 \rightarrow 4)- β -D-Frup-(1 \rightarrow 1)-D-Gal (1-galactosil-lactulosa), obtenidos por hidrólisis y transgalactosilación de la lactulosa con β -galactosidasas de *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus aculeatus* y *Aspergillus oryzae*, se han aislado y caracterizado estructuralmente, por primera vez.
- 2.- El trisacárido β -D-Galp(1 \rightarrow 4)- β -D-Galp(1 \rightarrow 4)-D-Fru (4'-galactosil-lactulosa) obtenido por isomerización en medio básico de la mezcla comercial VivinalGOS, se ha aislado y caracterizado por primera vez.
- 3.- Se han establecido las condiciones óptimas de temperatura, tiempo, pH, concentración de enzima y concentración de sustrato, para la síntesis enzimática de oligosacáridos a partir de lactulosa empleando β -galactosidasas de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym 3000L HP G), *Aspergillus aculeatus* (Pectinex Ultra SP-L) y *Aspergillus oryzae*.
- 4.- Se han isomerizado por primera vez mezclas de galactooligosacáridos en medio básico empleando aluminato sódico y optimizándose las condiciones de temperatura, tiempo y concentración de catalizador.
- 5.- A partir de los datos experimentales obtenidos se ha establecido un modelo matemático capaz de predecir la hidrólisis y transgalactosilación de la lactulosa mediante la utilización de las β -galactosidasas de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym 3000L HP G) y *Aspergillus aculeatus* (Pectinex Ultra SP-L).
- 6.- En cultivos de microorganismos puros se ha observado que todas las cepas ensayadas utilizan todos los oligosacáridos como sustratos, mostrando de manera general, preferencia por aquellos con enlaces β (1 \rightarrow 6) y β (1 \rightarrow 1).
- 7.- Los oligosacáridos con grado de polimerización igual o superior a 3, siendo la β -D-Galp(1 \rightarrow 6)- β -D-Galp(1 \rightarrow 4)-D-Fru (6'-galactosil-lactulosa) y la β -D-Galp(1 \rightarrow 4)- β -D-Frup-(1 \rightarrow 1)-D-Gal (1-galactosil-lactulosa) los compuestos mayoritarios, presentaron *in vitro*, un efecto bifidogénico similar o ligeramente superior al de la lactulosa.

- 8.- El índice prebiótico de los oligosacáridos derivados de la lactulosa con grado de polimerización igual o superior a 3, fue superior al de la lactulosa, mostrándose así una selectividad mayor hacia las bacterias beneficiosas constituyentes de la flora intestinal.

Aunque es necesario llevar a cabo más estudios, especialmente in vivo, los resultados presentados en esta memoria indican que las mezclas de oligosacáridos formados principalmente por la 6'-galactosil-lactulosa y la 1-galactosil-lactulosa podrían constituir una alternativa a la lactulosa como ingredientes prebióticos.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Aider, M., de Halleux, D.** (2007). Isomerization of lactose and lactulose production. Review. *Trends of Food Science and Technology*, 18: 356-364.
- Akaike, H.** (1974). A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 19 (6): 716-723.
- Alander, M., Mättö, J., Kneifel, W., Johansson, M., Kögler, B., Crittenden, R., y col.** (2001). Effect of galacto-oligosaccharide supplementation on human faecal microflora and on survival and persistence of bifidobacterium lactis Bb-12 in the gastrointestinal tract. *International Dairy Journal*, 11: 817-825.
- Al-Tamini, M. A. Y., Palframan, R. J., Cooper, J. M., Gibson, G. R., Rastall, R. A.** (2006). In vitro fermentation of sugar beet arabinan and arabinooligosaccharides by the human gut microflora. *Journal of Applied Microbiology*, 100: 407-414.
- Andrieux, C., Szylił, O.** (1992). Effects of galacto-oligosaccharides (TOS) on bacterial enzyme activities and metabolite production in rats associated with a human faecal flora. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 51: 7A (abs.).
- Audoly, S., Bellu, G., D'Angio, L., Saccomani, M. P., Cobelli, C.** (2001). Global identifiability of nonlinear models of biological systems. *IEEE Trans Biomedical Engineering*, 48(1): 55-65.
- Bakken, A. P., Hill, G. C., Amundson, C. H.** (1992). Hydrolysis of lactose in skim milk by immobilized beta-galactosidase (*Bacillus circulans*). *Biotechnology and Bioengineering*, 39 (4): 408-417.
- Ballonge, J., Schumann, C. Quignon, P.** (1997). Effects of lactulose and lactitol on colonic microflora and enzymatic activity. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 222: 41-44.
- Basson, M., Liu, Y. W., Hanly, A. M., Emenecker, N. J., Shenoy, S. G., Gould Rothberg, B. E.** (2000). Identification and comparative analysis of human short fatty acid response genes. *Journal of Gastroenterology Surgery*, 4: 501-502.
- Becker, D., Compagnone, D., Lu, L. L.** (2006). Lactulose in the treatment of constipation in pregnant Chinese women: A double-blind, randomized, placebo-controlled, multicenter study. *Gastroenterology*, 130 (4): A599-A600.

- Bertelsen, H.**, Jensen, B. B., Buemann, B. (1999). D-Tagatose-A novel low-calorie bulk sweetener with prebiotic properties. *Low-calorie sweeteners: present and future*, 85: 98-109.
- Bode, L.** (2006). Recent advances on structure, metabolism, and function of human milk oligosaccharides. *Journal of Nutrition*, 136: 2127-2130.
- Boehm, G.**, Stahl, B. Oligosaccharides, en *Functional Dairy products* (2003). Tiina Mattila-Sandholm, Mana Saarela (eds). Woodhead Publishing.
- Boehm, G.**, Stahl, B., Jelinek, J., Knol, J., Miniello, V., Moro, G. E. (2005). Prebiotic carbohydrates in human milk and formulas. *Acta paediatrica*, 94 (449): 18-21.
- Boon, M. A.**, Janssen, A. E. M., van der Padt, A. (1999). Modelling and Parameter Estimation of the Enzymatic synthesis.
- Boon, M. A.**, Janssen, A. E. M., Van't Riet, K. (2000) Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology*. 26: 271-281.
- Bornet, F. R.**, Brouns, F., Tashiro, Y., Duvillier, V. (2002). Nutritional aspects of short-chain fructooligosaccharides: natural occurrence, chemistry, physiology and health implications. *Digestive Liver Diseases*, 32 (2): S111-S120.
- Bouhnik, Y.**, Flourie, B., D'Agay-Abensour, L., Pochart, P., Gramet, G., Duran, M., Rambaud, J-C. (1997). Administration of transgalacto-oligosaccharides increases fecal bifidobacteria and modifies colonic fermentation metabolism in healthy humans. *Journal of Nutrition*, 127: 444-448.
- Bouhnik, Y.**, Raskine L., Simoneau G., Vicaud E., Neut C. Flourie B., Brouns F, Bornet FR (2004). The capacity of nondigestible carbohydrates to stimulate fecal bifidobacteria in healthy humans: a double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group, dose-response relation study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80: 1658-1664.
- Bouhnik, Y.**, Attar, A., Joly, F. A., Riottot M., Dyard, F., Flourie, B. (2004) Lactulose ingestion increases faecal bifidobacterial counts: a randomized double-blind study in healthy humans. *European Journal of clinical Nutrition*, 58: 462-466.
- Brandt, L. A.** (2001). Prebiotics enhance gut health. *Prepared Foods*, 170 (9): NS7-NS10.

- Bratten, J.**, Spanier, J., Jones, M. P. (2006). Lactulose hydrogen breath testing (LHBT) in patients with IBS and controls. Differences in methane (CH₄) but not hydrogen (H₂). *American Journal of Gastroenterology*, 101(9): S414-S415.
- Bridiau, N.**, Taboubi, S., Marzouki, N., Legoy, M. D., Maugard, T. (2006). β -Galactosidase catalyzed selective galactosylation of aromatic compounds. *Biotechnology Progress*, 22, 326–330.
- Cavaille, D.**, Combes, D. (1995). Characterization of beta-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnology Applied Biochemistry*, 43: 221-228.
- Chen, C. W.**, Ou-Yang, C. C., Yeh, C. W. (2003). Synthesis of galactooligosaccharides and transgalactosylation modeling in reverse micelles. *Enzyme and Microbial Technology*, 33: 497-507.
- Cheng, H. H.**, Lai, M. H. (2000). Fermentation of resistant rice starch produces propionate reducing serum and hepatic cholesterol in rats. *Journal of Nutrition*, 130: 1991-1995.
- Cheng, C. C.**, Yu, M. C., Cheng, T. C., Sheu, D. C., Duan, K. J., & Tai, W. L. (2006). Production of high-content galacto-oligosaccharide by enzyme catalysis and fermentation with *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology Letters*, 28, 793–797.
- Chockchaisawasdee, S.**, Athanasopoulos, V. I., Niranjana, K., Rastall, R. A. (2005) Synthesis of galacto-oligosaccharide from lactose using, *b*-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: Studies on batch and continuous UF membrane fitted bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 89: 434-443.
- Conway, P. L.** (2001). Prebiotics and human health: the state-of-the art and future perspectives. *Scandinavian Journal of Nutrition*, 45: 13-21.
- Cook, S. I.**, Sellin, J. H. (1998). Review article: short chain fatty acids in health and disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 12: 499-507.
- Coulier, L.**, Timmermans, J., Bas, R., Van den Dool, R., Haaksman, I., Klarenbeek, B., Slaghek, T., van Dongen, W. (2009). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Doi: 10.1021/jf902549e.
- Crittenden, R. G.** (1999). Probiotics: A Critical Review. Horizon Scientific Press.
- Crittenden, R. G.** y Playne, M. J. (1996). Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends in Food Science and Technology*, 7 (11): 353-361.

- Cummmings, J. H.** (1995). Short chain fatty acids. In Human Colonic Bacteria: Role in Nutrition, physiology and Health. Ed. Gibson, G. R. and MacFarlane, G. T. Pp 101-130. Boca Raron : CRC Press.
- Cummings, J. H.**, Roberfroid M. B. and members of the Paris carbohydrate group, Andersson H., Barth C., Ferroluzzi A., Ghooos Y., Gibney M., Hermonsen K., James W. P. T., Korver O., Lairon D., Pascal G., Voragen A. G. S. (1997). Review. A new look at dietary carbohydrate. Chemistry, physiology and health. *European Journal of Clinical Nutrition*, 51: 417-423.
- Cummings, J.H.**, McFarlane, G.T. (1991). The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *Journal of Applied Bacteriology*, 70: 443-459.
- Della Ragione, F.**, Criniti, V., Della Pietra, V., Borrielo, A., Oliva, A., Indaco, S., Yamamoto, T., Zappia, V. (2001). Genes modulated by histoneacylation as new effectors of butyrate activity. *FEBS Letters*, 499: 199-204.
- De Man, J.C.**, Rogosa, M., Sharpe, E., 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23, 130-135.
- Del Val, M. I.**, Hill, C. G., Jiménez-Barbero, J., Otero, C. (2001) Selective enzymatic synthesis of 6'-galactosyl lactose by Pectinex Ultra SP in water. *Biotechnology Letters*, 23:1921-1924.
- Del Val, M. I.**, Otero, C. (2003) Biphasic aqueous media containing polyethylene glycol for the enzymatic synthesis of oligosaccharides from lactose. *Enzyme and Microbial Technology*, 33: 118-126.
- Dumortier, V.**, Brassart, C., Bouquelet, S. (1994). Purification and properties of a beta-D-galactosidase from Bifidobacteirum-bifidum exhibiting a transgalactosylation reaction. *Biotechnology and Applied biochemistry*, 19 (3): 341-354.
- Duncan, S. H.**, Barcenilla, A., Stewart, C. S., Pryde, S. E., Flint, H. J. (2002). Acetate utilization and butyryl coenzyme A (CoA), acetate CoA transferase in butyrate producing bacteria from the human large intestine. *Applied Environmental Microbiology*, 68: 5186-5190.
- Egea, J. A.**, Rodríguez-Fernández, M., Banga, J. R. Martí, R. (2007) Scatter search for chemical and bio-process optimization. *Global Optimization*, 37:481-503.

- Engfer, M. B.,** Stahl, B., Finke, B., Sawatzki, G., Daniel, H. (2000). Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper gastrointestinal tract. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71: 1589- 1596.
- Ferchaud-Roucher, V.,** Pouteau, E., Piloquet, H., Zair, Y., Krempf, M. (2005). Colonic fermentation from lactulose inhibits lipolysis in overweight subjects. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 289 (4): E716-E720.
- Franks, A. H.,** Harmsen, H. J. M., Raangs, G. C., Jansen, G. J., Schut, F., Welling, G. W. (1998). Variations of bacterial populations in human faeces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Applied Environmental Microbiology*, 64: 3336-3345.
- Gewolb, I. H.,** Schwalbe, R.S., Taciak, V. L., Harrison, T. S., Panigrahi, P. (1999). Stool microflora in extremely low birthweight infants. *Archives of disease in childhood*, 80 (3): F167-F173.
- Gibson G. R.** (1998). Dietary modulation of human gut microflora using prebiotics. *British Journal of Nutrition*, 80: S209-S212.
- Gibson, G. R.** (2004). From probiotics to prebiotics and a healthy digestive system. *Journal of Food Science*, 69: M141-M143.
- Gibson, G. R.,** Fuller, R. (2000). Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *Journal of Nutrition*, 130: 391S-395S.
- Gibson, G. R.,** McCartney, A. L. Y Rastall, R. A. (2005). Prebiotics and resistance to gastrointestinal infections. *British Journal of Nutrition*, 93 (1): S31-S34.
- Gibson, G. R.,** Roberfroid, M-B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota. *Journal of Nutrition*, 125: 1401-1412.
- Gibson, G. R.,** y McFarlane, G.T. (eds). (1995). Human Colonic Bacteria: Role in Nutrition, Physiology and Pathology. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Gibson, G. R.,** Otaway, P.B., Rastall, R.A. (2000). In Prebiotics. New developments in functional foods. Chadwick House Group Limites.
- Gibson, G. R.,** Probert, H. M., Van Loo, J., Rastall, R.A., Roberfroid, M. (2004) Dietary modulation of the human colonic microbiota : updating the concept of probiotics. *Nutritional Research Reviews*, 17: 259-275.

- Gibson, G. R.,** Wang, X. (1994). Bifidogenic properties of different types of fructooligosaccharides. *Food Microbiology*, 11: 491-498.
- Gibson, G. R.,** Wang, X. (1994b). Enrichment of bifidobacteria from human gut contents by oligofructose using continuous culture. *FEMS Microbiology Letters*, 118: 121-128.
- Gnoth, M. J.,** Kunz, C., Kinne-Saffran, E., Rudloff, S. (2000). Human milk oligosaccharides are minimally digested in vitro. *Journal of Nutrition*, 130: 3014-3020.
- Gopal, P. K.,** Sullivan, P. A., Smart, J.B. (2001) Utilisation of galactooligosaccharides as selective substrates for growth by lactic acid bacteria including *Bifidobacterium lactis* DR10 and *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *International Dairy Journal*, 11: 19-25.
- Gröndlund, M. M.,** Lehtonen, O.P., Eerola, E., Kero, P. (1999) Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 28:19-25.
- Harmsen, H. J. M.,** Elferrich, P., Schut, F., Welling, G. W. (1999). A 16S rRNA-targeted probe for detection of lactobacilli and enterococci in faecal samples by fluorescent in situ hybridization. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 11: 3-12.
- Harmsen, H. J. M.,** Wildeboer-Veloo, A. C. M., Grijpstra, J., Knol, J., Degener, J. E., Welling, G.W. (2000). Development of 16S rRNA-based probes for the *Coriobacterium* group and the *Atopobium* cluster and their application for enumeration of *Coriobacteriaceae* in human feces from volunteers of different age groups. *Applied Environmental Microbiology*, 66: 4523-4527.
- Heine, W.,** Uhlmann, M., Mohr, C. (1998). Physiological colonization of the intestinal tract in infants, pathological variations and nutritional influences. *Monatsschrift Kinderheilkunde*, 146 (8): S7-S8 (Supplement 1).
- Hidaka, H.,** Hirayama, M. and Sumi, N. (1988). A fructooligosaccharide-producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611. *Agricultural Biology and Chemistry*, 52: 1181-1187.
- Hirayama, M.** (2002). Novel physiological functions of oligosaccharides. *Pure Applied Chemistry*, 74 (7): 1271-1279.
- Hsu, C. A.,** Lee, S. L., Chou, C. C. (2007). Enzymatic Production of Galactooligosaccharides by β -Galactosidase from *Bifidobacterium longum* BCRC 15708. *Journal of Agricultural and Food chemistry*. (in press).

- Huber, R. E.**; Kurz, G.; Wallenfels, K. (1976). A Quantitation of the factors which affect the hydrolase and transgalactosylase activities of β -galactosidase (*E. coli*) on lactose. *Biochemistry*, 15: 1994-2001.
- Ito, M.**, Deguchi, Y., Mitamori, A., Matsumoto, K., Kikuchi, H., Kobayashi, Y., Yajima, T., Kan, T. (1990) Effects of administration of galactooligosaccharides on the human fecal microflora, stool weigh and abdominal sensation. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 3: 285-292.
- Ito, M.**, Kimura, M., Deguchi, Y., Miyamori-Watabe, A., Yajima, T., Kan, T. (1993). Effects of transgalactosylated disaccharides on the human intestinal microflora and their metabolism. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 39: 279-288.
- Irazoqui, G.**, Giacomini, C., Batista-Viera, F., Brena, B. M. (2007). Hydrophilization of immobilized model enzymes suggests a widely applicable method for enhancing protein stability in polar organic co-solvents. *Journal of molecular catalysis B- Enzymatic*, 46 (1-4): 43-51.
- Iwasaki, K.** Nakajima, M., Nakao, S. (1996). Galacto-oligosaccharide production from lactose by an enzymatic batch reaction using β -galactosidase. *Process of Biochemistry*, 31: 69-76.
- Ji, E. S.**, Park, N. H., Oh, D. K. (2005). Galacto-oligosaccharide production by a thermostable recombinant beta-galactosidase from *Thermotoga marina*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21 (5): 759-764.
- Joshi, M.**, Seidel-Morgenstern, A., Kremling, A. Exploiting the bootstrap method for quantifying parameter confidence intervals in dynamical systems. (2006) *Metabolic Engineering*, 8: 447-455.
- Kajihara, M.**, Kato, S., Konishi, M., Yamagishi, Y., Shiraishi, H. , Konishi, M., Nakamura, Y., Horie, Y., Yokoyama, H., Iino, T., Kiso, Y., y Ishii, H. (1999). Effect of xylooligosaccharides on blood ammonia level. *Hepatology*, 30 (4): 528 Parte 2 (Suplemento S).
- Kajihara, M.**, Kato, S., Konishi, M., Yamagishi, Y., Horie, Y., Ishii, H. (2000). Xylooligosaccharide decreases blood ammonia levels in patients with liver cirrhosis. *The American Journal of Gastroenterology*, 95 (9): 2514
- Kajihara, M.**, Kato, S., Iino, T., Kiso, Y., Konishi, M., Yamagishi, Y., Horie, Y., Ishii, H. (2001). Beneficial effects of xylooligosaccharides on ammonia metabolism in rats. *Hepatology*, 34 (4): 1518 Parte 2 (Suplemento S).

- Kalinowski, H. O.**, Berger, S., Braun S. (1988). *Carbon-13 NMR Spectroscopy*; John Wiley and Sons: New York 1988; Chapter 4.
- Kaneko, T.**, Kohmoto, T., Kikuchi, H., Shiota, M., Iino, H., Mitsuoka, T. (1994). Effects of isomaltooligosaccharides with different degrees of polymerization of human fecal bifidobacteria. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 58 (12): 2288-2290.
- Kaplan, H. y Hutkins R. W.** (2000) Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2682-2684.
- Kasper, H.** (1996). Viable microorganisms in fermented milks-Significance for prophylaxis and therapy. *Ernährungs-Umschau*, 43 (2):40
- Kim, C. S.**, Ji, E. S., Oh, D. K. (2004). A new kinetic model of recombinant beta-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* for both hydrolysis and transgalactosylation reactions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 316(3): 738-743.
- Kokke, F.T.**, Scholtens, P. A., Alles, M. S., Decates, T. S., Fiselier, T. J., Tolboom, J. J., Kimpen, J. L., Benninga, M. A. (2008). A dietary fiber mixture versus lactulose in the treatment of childhood constipation: a double-blind randomized controlled trial. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 47: 592-597.
- Kunz, C. y Rudloff, S.** (2006). Health promoting aspects of milk oligosaccharides. *International Dairy Journal*, 16: 1341-1346.
- Kunz, V.**, Rudloff, S., Baier, W., Klein, N., Strobel, S. (2000). Oligosaccharides in human milk: Structural, Functional and Metabolic Aspects. *Annual Review of Nutrition*, 20: 699-722.
- Kuo, T. M.**, Vanmiddlesworth, J. F., Wolf, W. J. (1988). Content of raffinose oligosaccharides and sucrose in various plant seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36: 32-36.
- Langendijk, P.S.**, Schut, F., Jansen, G.J., Raangs, G.C., Kamphnis, G. R., Wilkinson, M. H.F., Welling, G. W. (1995). Quantitative fluorescence in situ hybridization of Bifidobacterium spp., with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in faecal samples. *Applied Environmental Microbiology*, 61: 3069-3075.
- Ljung, L.** System Identification: Theory for the User. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 1999

- Mackie, R. I.**, Abdelghani, S., Gaskins, R. (1999). Developmental microbial ecology of the gastrointestinal tract. *American Journal of Clinical Nutrition*, 69 (Supplement):1035-1045.
- Macy, J.**, Ljungdahl, L.; Gottschalk, G. (1978). Pathway of succinate and propionate formation in *Bacteroides fragilis*. *Journal of Bacteriology*, 134, 84-91.
- Macfarlane, G. T.** & Cummings, J. H. (1991). The colonic fermentation and large bowel digestive function. In *The Large Intestine: Physiology, Pathophysiology and Disease*. Ed. S. F. Phillips, J. H. Pemberton and R. G. Shorter. Pp. 51-92. New York: Raven Press Ltd.
- MacFarlane, S.**, MacFarlane, G. T. (2003). Food and the large intestine. In *Gut Flora, Nutrition, Immunity and Health*. Ed. Fuller, R. and Perdigon, G. pp.24-51. Oxford: Blackwell Publishing.
- MacFarlane, S.**, MacFarlane, G.T., Cummings, J. H. (2006). Prebiotics in the gastrointestinal tract. *Alimentary, Pharmacology and Therapeutics*, 24 (5): 701-714.
- MacFarlane G.T.**, Steed, H., MacFarlane S. (2008). Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of Applied Microbiology*, 104 (2): 305-344.
- McCartney, A. L.**, Gibson, G. R. (1998). The application of prebiotics in human health and nutrition. In *Proceeding lactic 97. Which Strains? For Which Products?* Adria Normandie Villers Bocage, Cedex, France, pp59-73.
- McMeekin, T. A.**, Olley, J.N., Ross, T., Ratkowsky, D. A. (1993). *Predictive microbiology: Theory and application*. Somerset, England: Research. Studies Press Ltd.
- Mahoney, R. R.** (1998) Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. *Food Chemistry*, 63 (2): 147-154.
- Manning, T. S.**, y Gibson G. R. (2004) Prebiotics. *Best practice Research in clinical Gastroenterology*, 18(2): 287-298.
- Manz, W.**, Amana, R., Ludwig, W., Vancanneyt, M., Schleifer, K. H. (1996). Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides in the natural environment. *Microbiology*, 142: 1097-1106.
- Marteau, P.** (2001). Prebiotics and probiotics for gastrointestinal health. *Clinical Nutrition*, 20 (1):41-45.

- Matsuki, T.,** Watanabe, K., Tanaka, R., Fukuda, M., Oyaizu, H. (1999). Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA gene-targeted species-specific primers *Applied Environmental Microbiology*, 65: 4506-4512.
- Matsuki, T.,** Watanabe, K., Fujimoto, J., Miyamoto, Y., Takada, T., Matsumoto, K., Oyaizu, H., Tanaka, R. (2002). Development of 16S rRNA gene targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Applied Environmental Microbiology*, 68: 5445-5451.
- Matsumoto, K.,** Kobayahi, Y., Ueyama, S., Watanabe, T., Tanaka, T., Kan, T., Kuroda, A., & Sumihara, Y. (1993). Galactooligosaccharides. In T. Nakanuki, Oligosaccharides. Production, Properties and Applications. *Japanese technology reviews*, 3 (2). New York: Gordon: Gordon and Breach Science Publishers. pp 90-106.
- Maugard, T.,** Gaunt, D., Legoy, M. D., Besson, T. (2003). Microwave-assisted synthesis of galacto-oligosaccharides from lactose with immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnology Letters*, 25, 623-629.
- Mayer, J.,** Conrad, J., Klaiber, I., Luntz-Wahl, S., Beiffus, U., Fisher, L. (2004). Enzymatic production and complete nuclear magnetic resonance assignment of the sugar lactulose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 6983-6990.
- Mendez, A. y Olano, A.** (1979) Lactulosa. A review of some chemical properties and application in infant nutrition and medicine. *Dairy Sciences Abstracts*, 41: 531-535.
- Molis, C.,** Flourie, B., Ouarne, F., Gailing, M.F., Lartigue, S. & Guibert, A. (1996) Digestion, excretion, and energy value of fructooligosaccharides in healthy humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 64, 324-328.
- Molly K.,** Vande Woestyne, M, Verstraete, W. (1993). Development of a 5-step multi-chamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 139: 254-258.
- Mozaffar, Z.,** Nakanishi, K., Matsumo, R., 1985. Formation of oligosaccharides during hydrolysis of lactose in milk using β -galactosidase from *Bacillus circulans*. *Journal of Food Science*, 50, 1602-1606.
- Mullis, K.** (1998). *Dancing Naked in the Mind Field*. New York: Pantheon Books. ISBN 0-679-44255-3.

- Mussato, S. I.,** Mancilha, I. M. (2007). Non-digestible oligosaccharides: a review. *Carbohydrate Polymers*, 68: 587-597.
- Nagendra, R.,** Mahadevamma, S., Baskaran, V., Rao, S.V. (1995) Shelf-life of spray-dried infant formula supplemented with lactulose. *Journal of Food Processing and Preservation*, 19: 303-315.
- Nakakuki, T.** (1993). Oligosaccharides. Production, properties and applications. En: Nakakuki T, ed. Japanese Technology Reviews. Vol 2. 3. New York: Gordon y Breach Sci. Publishers.
- Neri , D. F. M.,** Balcão, V. M., Costa R. S., Rocha I. C. A. P., Ferreira, E. M. F. C., Torres, D. P. M., Rodrigues, L. R. M., Carvalho, L. B. Jr., Teixeira, J. A. (2009). Galacto-oligosaccharides productions during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae* β -galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol. *Food Chemistry*. 115: 92-99.
- Olano, A.,** Juárez, M. (2005). Introducción. En Alimentos Funcionales. Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología. Rumagraf, Madrid. 7-9
- Onishi, N.,** Yamashiro, A., Yokozeki, K. (1995) production of galacto-oligosaccharide from lactose by *Sterigmatomyces elviae* CBS8119. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(11): 4022-4025.
- Özer, D.,** Akin, S., Özer, B. (2005). Effect of inulin and lactulose on survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* BB-02 in acidophilus-Bifidus yoghurt. *Food Science and Technology International*, 11: 19-24.
- Palframan, R.,** Gibson, G. R., Rastall, R. A. (2003). Developmento of a quiantitative tool for the comparison of the prebiotic effect of dietary oligosaccharides. *Letters in Applied Microbiology*, 37 (4): 281-284.
- Panesar, P. S.,** Panesar, R., Singh, R. S., Kennedy, J. F., Kumar, H. (2006). Microbial production, immobilization and applications of β -galactosidase. *Journal of chemical technology and biotechnology*, 81 (4): 530-543.
- Penders, J.,** Thijs, C., Vink., C., Stelma, F. F., Snijders, B., Kummeling, I., van den Brandt, P. A., Stobberingh, E. E. (2006). Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infance. *Pediatrics*, 118 (2): 511-521.
- Petuely F.** (1957). Der Bifidusfaktor. *Dtsch Med Wochenschr*, 82(46):1957-1960.
- Pham, T. T.,** Shah, N. P. (2008). Effects of lactulose supplementation on the growth of *Bifidobacteria* and biotransformation of isoflavone glycosides to

- isoflavone aglycones in soymilk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 4703-4709.
- Pham, T. T.,** Shah, N. P. (2008b) Effect of lactulose on biotransformation of isoflavone glycosides to aglicones in soymilk by *Lactobacilli*. *Journal of Food Science*, 73: 158-165.
- Pomare, E. W.,** Branch W. J., Cummings, J. H. (1985). Carbohydrate fermentation in the human colon and its relation to acetate concentration in venous blood. *Journal of Clinical Investigation*, 75: 1448-1454.
- Porkka, L.,** Salminen, E., Salminen, S. (1988). The effects of lactulose-sweetened yoghurt on the rate of gastric emptying and intestinal transit in healthy human volunteers. *Z. Ernährungswiss*, 27: 150-154.
- Posada, D.,** Buckley, T. R. (2004). Model Selection and Model Averaging in Phylogenetics: Advantages of Akaike Information Criterion and Bayesian Approaches Over Likelihood Ratio Tests. *Systems Biology*. 53(5):793-808.
- Prenosil, J. E.,** Stuker, E., Bourne, J. R. (1987). Formation of oligosaccharides during enzymatic hydrolysis of lactose: Part I: State of the art. *Biotechnology and Bioengineering*, 30, 1019-1025.
- Pritchard, D. J.,** Bacon, D.W. (1978). Prospects for reducing correlations among parameter estimates in kinetic models. *Chemical Engineering Science*, 33: 1539-1543.
- Pryde, S. E.,** Duncan, S. H., Hold, G.L. Stewart, C. S., Flint, H. J. (2002). The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiology Letters*, 217(2): 133-139.
- Roberfroid, M. B.** (2005). Inulin-Type Fructans. Boca Raton: CRC Press.
- Roberfroid, M. B.** (2007). Prebiotics: The concept revisited. *Journal of Nutrition*, 137 (3): 830S-837S.
- Roberfroid, M. B.,** y Delzenne, N. M. (1998). Dietary fructans. *Annual Review of Nutrition*, 18: 117-143.
- Roberfroid, M. B.,** y Slavin, J. (2000). Nondigestible oligosaccharides. *Critical Reviews in Food science and Nutrition*, 40: 461-480.
- Rodríguez-Fernández, M.,** Mendes, P. y Banga, J. R. (2006). A hybrid approach for efficient and robust parameter estimation in biochemical pathways. *BioSystems*, 83:248-265.

- Rowland, I. R.,** Tanaka, R. (1993) The effects of transgalactosylated oligosaccharides on gut flora metabolism in rats associated with human faecal microflora. *The Journal of Applied Bacteriology*, 74: 667-674.
- Rumi, G.,** Tsubouchi .R., Okayama. M., Kato. S., Mozsik. G., Takeuchi. K. (2004). Protective effect of lactulose on dextran sulphate sodium-induced colonic inflammation in rats. *Digestive Diseases and Sciences*, 49 (9): 1466-1472.
- Ruttloff, H.,** Täufel, A., Haenel, H. & Täufel, K. (1967). Die intestinal-enzymatische Spaltung von Galakto-oligosacchariden im Darm von Tier und Mensch mit besonderer Berücksichtigung von *Lactobacillus bijidus*. 3: Mitt. Carbohydratische. 15: 65-76. 1155-1 157. Aktivitat ausgewählter Mikroorganismen der Darmflora. *Nahrung*, 11: 47-54.
- Rycroft, C. E.,** Jones, M. R., Gibson, G. R., Rastall, R. A. (2001). A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic. *Journal of Applied microbiology*, 91: 878-887.
- Saarela, M.,** Lähteenmäki, R., Crittenden, R., Salminen, S., Mattila-Sandholm, T. (2002). Gut bacteria and health foods-the European perspective. *International Journal of Food Microbiology*, 78: 99-117.
- Sahota, S. S.,** Bramley, P. M., Menzies, I. S. (1992). The fermentation of lactulose by colonic bacteria. *Journal of General Microbiology*, 128: 319-325.
- Sako, T.,** Matsumoto, K., Tanaka, R. (1999). Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. *International Dairy Journal*, 9, 69-80.
- Salazar, N.,** Gueimonde, M., Hernández-Barranco, A. M., Ruas-Madiedo, M., González de los reyes-Gavilán, C. (2008) Bifidobacterium exopolysaccharides fermented by human microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (15): 4737-4745.
- Santos, A. M. P.** (2002). Síntese de oligosacarídeos a partir da sacarose por inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *Bulgaricus*. Tese de doutorado, FEA/UNICAMP.
- Santos, A.,** San Mauro, M., Marquina Diaz, D. (2006). Prebiotics and their long-term influence on the microbial populations of the mouse bowel. *Food Microbiology*, 23: 498-503.
- Sanz, M. L.,** Gibson, G. R., Rastall, R. A. (2005). Influence of disaccharide structure on prebiotic selectivity in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 5192-5199.

- Schley, P. D.**, and Field, C. J. (2002). The immune-enhancing effects of dietary fibres and prebiotics. *British Journal of Nutrition*, 87: S221-S230 (Suppl. 2).
- Scholz-Ahrens, K. E.**, Schaafsma, G., van den Heuvel, E. G. H. M., y Schezenmeir, J. (2001). Effects of prebiotics on mineral metabolism. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 459S-464S.
- Shiavoshian, S.**, Segain, J. P., Kornprobst, M., Bonnet, C., Cherbut, C., Galmiche, J-P., Blotière, H. M. (2000) Butyrate and trichostatin A effects on the proliferation/differentiation of human intestinal epithelial cells: induction of cyclin D3 and p21 expression. *An International Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 46 (4): 507-514.
- Shin, H. J.**, Yang, J. W. (1998). Enzymatic production of galactooligosaccharide by *Bullera singularis* beta-galactosidase. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8 (5): 484-489.
- Sinclair, H. R.**, De Slegte, J., Gibson, G. R., Rastall, R. A. (2009). Galactooligosaccharides (GOS) inhibit vibrio cholera toxin binding to its GM1 receptor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 3113-3119.
- Smith, P. K.**, Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K., Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150: 76-85.
- Soergel, K. H.** (1994). Colonic fermentation: metabolic and clinical implications. *Clinical Investigation*, 72 (10): 742-748.
- Song, Y.**, Kato, N., Liu, C., Matsumiya, Y., Kato, H., Watanabe, K. (2000). Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. *FEMS Microbiology Letters*, 187: 167-173.
- Splechtna, B.**, Nguyen, T. H.; Steinbo" C. K. M.; Kulbe, K. D.; Lorenz, W.; Haltrich, D. (2006). Production of prebiotic galactooligosaccharides from lactose using,-galactosidase from *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 4999-5006.
- Stanton C.**, Desmond C., Coakley, M., Collins, J. K., Fitzgerald, G., and Ross, R.P. (2003). Challenges facing development of probiotic-containing foods. En Handbook of Fermented Functional Foods. Farnworth, E.R. editor. CRC Press. Boca Raton. pp 27-58.

- Swallow, K. W.,** Low, N. H. (1990). Analysis and quantitation of the carbohydrates in honey using high performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38: 1828-1832.
- Swennen, K.,** Courtin, C. M., Delcour, J. A. (2006). Non-digestible oligosaccharides with prebiotic properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46: 459-471.
- Tanaka, R.,** Takayama, H., Morotomi, M., Kuroshima, T., Ueyama, S., Matsumoto, K., Kuroda, A., Mutai, M. (1983). Effects of administration of TOS and *Bifidobacterium breve* 4006 on the human fecal flora. *Bifidobacteria Microflora*, 2: 17-24.
- Tuohy, K. M.,** Ziemer, C. J., Cherie, J., Klinder, A., Knoebel, Y., Pool-Zobel, B.L., Gibson, G.R. (2002). A human volunteer study to determine the prebiotic effects of lactulose powder on human colonic microbiota. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 14: 165-173.
- Tuohy, K. M.,** Rouzaud, G. C. M., Brück, W. M., Gibson, G. R. (2005) Modulation of the human gut microflora towards improved health using prebiotics-Assesment of efficacy. *Current Pharmaceutical Desing*, 11: 75-90.
- Tzortis, G.,** Vulevic, J. (2009). Galacto-oligosaccharide prebiotics. In *Prebiotics and Probiotics. Science and Technology*. Charabampopoulos, D., Rastall, R. A. (Eds). Springer (New York). XXIV, 1265p.
- Schley, P.D.,** y Field, C. J. (2002). The immune-enhancing effects of dietary fibres and prebiotics. *British Journal of Nutrition*, 87(2): S221-S230.
- Splechtna, B.,** Nguyen, T.H., Steinbock, M., Kulbe, K.D., Lorenz, W., Haltrich, D. (2006). Production of prebiotic galactooligosaccharides from lactose using β -galactosidase from *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 4999-5006.
- Szilagyi, A.** (2002). Review article: lactose-a potential prebiotic. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 16: 1591-1602.
- Terada, A.,** Hara, H., Kato, S., Kimura T., Fujimori, I., Hara, K., Maruyama, T., Mitsuoka, T. (1993). Effect of lactosucrose (4-G-beta-D-galactosylsucrose) on fecal flora and fecal putrefactive products of cats. *Journal of Veterinary Medical Science*, 55: 291-295.
- Tomoda, T.,** Nalano, Y., Kageyama T. (1991). Effect of yogurt and yogurt supplemented with *Bifidobacterium* and/or lactulose in healthy persons: a comparative study. *Bifidobacteria Microflora*, 10: 123-130.

- Tomomatsu, H.** (1994). Health effects of oligosaccharides. *Food Technology*, 48: 6165.
- Topping, D. L.** (1996). Short-chain fatty acids produced by intestinal bacteria. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 5: 15-19.
- Tungland, B. C., y Meyer, D.** (2002). Nondigestible oligo- and polysaccharides (dietary fiber): their physiology and role in human health and food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3: 73-92.
- Tuohy, K. M., Ziemer, C. J., Klinder, A., Knöbel, Y., Pool-Zobel, B. L., Gibson, G. R.** (2002). A human volunteer study to determine the prebiotic effects of lactulose powder on human colonic microbiota. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 14: 165-173.
- Urashima, T., Kawai, Y., Nakamura, T., Arai, I., Saito, T., Namiki, M., Yamaoka, K., Kawahawa, K., Messer, M.** (1999). Chemical characterization of six oligosaccharides in a sample of colostrums of the brown capuchin, *Cebus apella* (Cebidae: Primates). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 124: 295-300.
- Van Casteren, W. H. M., Eimermann, M., van den Broek, L. A. M.** (2000). Purification and characterisation of a beta-galactosidase from *Aspergillus aculeatus* with activity towards (modified) exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* B39 and B891. *Carbohydrate Research*, 329 (1): 75:85.
- Van Den Broek, A.** (1993). Functional foods: *The Japanese approach*. *International Food Ingredients*, 1 (2): 4-9.
- Van Boekel, T.** Kinetic Modeling of Reactions In Foods. Boca Raton: CRC Press, 2008.
- van Laere, K. M. J., Abee, T., Schols, H. A., Beldman, G. y Voragen, A. G. J.** (2000) Characterization of a novel β -galactosidase from *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083 active towards transgalactooligosaccharides. *Applied Environmental Microbiology*, 66: 1379-1384.
- Van Laere, K. M. J., Hartemink, R., Bosveld, M., Schols, H. A., Voragen, A. G. J.** (2000). Fermentation of plant cell wall derived polysaccharides and their corresponding oligosaccharides by intestinal bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (5): 1644-1652.
- Vanhoutte, T., De Preter V., De Brandt E., Verbeke K., Swings J., Huys G.** (2006). Molecular monitoring of the fecal microbiota of healthy human

- subjects during administration of lactulose and *saccharomyces boulardii*. *Environmental Microbiology*, 72 (9): 5990-5997.
- Vitoria Miñana, I.** (2007). Probióticos, prebióticos y simbióticos. *Pediatría Integral*, XI (5): 425-433.
- Voght, J. A.**, Ishii-Schrade, K. B., Pencharz, P. B., Jones, P. J. H., Wolever T. M. S. (2006). L-rhamnose and lactulose decrease serum triacylglycerols and their rates of synthesis, but do not affect serum cholesterol concentrations in men. *Journal of Nutrition*, 136 (8): 2160-2166.
- Voragen, A. G. J.** (1998). Technological aspects of functional food-related carbohydrates. *Trends in food Science and Technology*, 9: 328-335.
- Wallenfels, K.**, Weil, R., "β-Galactosidase" In "The enzymes" (Ed. P.D. Boyer) (Academic, New York, 1972), Vol. 7, 3rd ed.
- Walter, E.**, Pronzato, L. Identification of Parametric Models from Experimental Data. Springer, 1997.
- Walter, J.**, Tannock, G. W., Tilsala-Timisjarvi, A., Rodtong, S., Loach, D. M., Munro, K. M., Alatossava, T. (2000). Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Applied Environmental Microbiology*, 66: 297-303.
- Wang, R.-F.**, Cao, W.-W., Campbell, W.L., Hairston, L., Franklin, W., Cerniglia, C.E. (1994). The use of PCR to monitor the population abundance of six human intestinal bacterial species in an in vitro semicontinuous culture system. *FEMS Microbiology Letters*, 124: 229-238.
- Wang, X.**, Gibson, G. R. (1993). Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *Journal of Applied Bacteriology*, 75: 373-380.
- Weber, F. L.** (1996). Lactulose and combination therapy of hepatic encephalopathy: the role of the intestinal microflora. *Digestive Diseases*, 14 (1): 53-63.
- Wolever, T. M.**, Fernandes, J., Rao, A. V. (1996). Serum acetate: propionate ratio is related to serum cholesterol in men but not women. *Journal of Nutrition*, 126: 2790-2797.
- Xu, Y.** (2001). Perspectives on the 21st century development of functional foods: bridging Chinese medicated diet and functional foods. *International Journal of Food Science and Technology*, 36: 229-242.

- Zhou Q. Z. K.,** Chen, X. D. (2001). Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biochemical and Engineering Journal*, 9: 33-40.
- Zokaee, F.,** Kaghazchi, T., Zare, A., Soleinabi, M. (2002). Isomerization of lactose to lactulose-study and comparison of three catalytic systems. *Process of Biochemistry*, 37: 629-635.
- Zoran, D.,** Barhoumi, R., Burghardt, R., Chapkin, R., Lupton, J. (1997). Diet and carcinogen alter luminal butyrate concentration and intracellular pH in isolated rat colonocytes. *Nutrition and Cancer*, 27: 222-230.

